

Universidad Autónoma Metropolitana



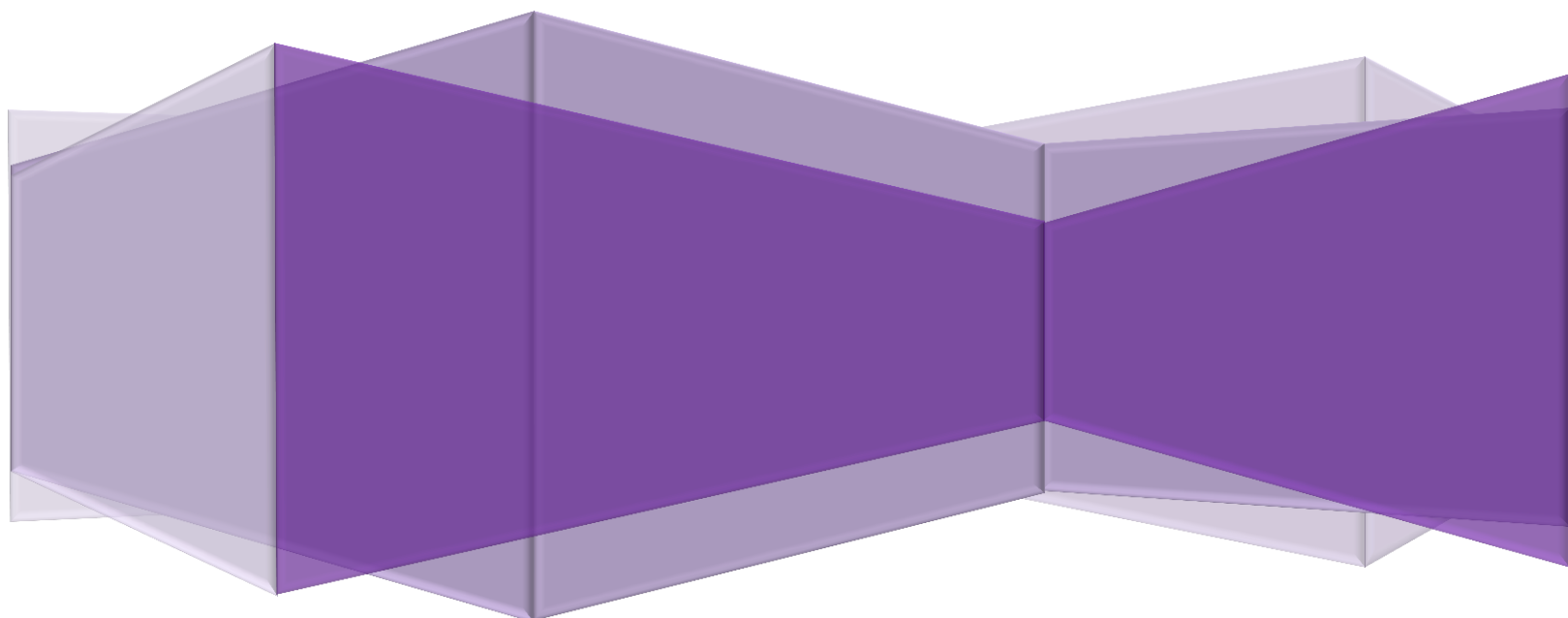
BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE FRACCIÓN PESADA EN SUELO, POR HONGOS LIGNINOLÍTICOS INMOVILIZADOS

**Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias e Ingeniería presenta**

I.Q. Luz Arianna Cárdenas Matus 2143803858

ASESORAS: M. en C. I. María del Rocío Cruz Colín

Dra. María Teresa Castañeda Briones



Dedicatoria:

A Dios que me permite tener vida para continuar, a mi familia por apoyarme en todo momento a seguir con mis ideales, a mi prometido Alain por cuidarme y apoyarme, a mis pequeños de cuatro patitas por darme fuerza para seguir en momentos difíciles.

Al maestro Miguel Ávila por apoyarme en el transcurso de mi proyecto. A la doctora María Teresa Castañeda por impulsar mi conocimiento desde las aulas. A la maestra Roció Cruz por el apoyo, por el conocimiento adquirido y la sabiduría que me brindo. Muchas gracias.

A mi mamá, espero estés orgullosa.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	viii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Importancia del suelo	5
Suelos del estado de Tabasco	6
Características y uso de suelo de “La Chontalpa”	7
Contaminación del suelo por hidrocarburos	8
Técnicas empleadas para remover hidrocarburos del suelo	10
Biorremediación	11
Características de la biorremediación	12
Ventajas y desventajas de la biorremediación	16
Uso de hongos ligninolíticos en la biorremediación	17
Características de los hongos ligninolíticos	17
Enzimas ligninolíticas	18
Lignina peroxidasa	19
Manganeso peroxidasa	19
Lacasa	20
Hongos de vida libre e inmovilizados	21
El hongo ligninolítico <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	22
El hongo ligninolítico <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	23
ANTECEDENTES	25
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	32
Hipótesis	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
DISEÑO DE EXPERIMENTOS	34
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	37
Muestreo y caracterización del suelo	38
pH	40

Pérdidas al secado.....	41
Humedad	42
Nitrógeno total.....	43
Nitrógeno inorgánico	45
Materia orgánica	46
Capacidad de retención de agua.....	47
Fósforo.....	48
Hidrocarburos.....	49
Extracción	49
Cuantificación.....	50
Acondicionamiento de las cepas	51
Resiembra de las cepas	51
Preparación de los inóculos	52
Inmovilización de las cepas.....	53
Pruebas de degradación	56
Evaluación del porcentaje de remoción	57
Determinación de las actividades enzimáticas	59
Lacasa	60
Manganeso peroxidasa	61
Lignina peroxidasa	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
Muestreo	64
Caracterización del suelo	65
Inmovilización de las cepas.....	66
Análisis de hidrocarburos, extracción y cuantificación	69
Actividades enzimáticas	73
Actividad enzimática de Lacasa	73
Actividad enzimática de Manganeso Peroxidasa.....	75
Actividad enzimática de Lignina peroxidasa	77
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	82
REFERENCIAS	84
Anexo 1: Gráficas de las diferentes actividades enzimáticas a través del tiempo	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo	...8
Tabla 2. Técnicas empleadas en la restauración de suelos.	...9
Tabla 3. Fugas por entidad registradas en el primer trimestre	...28
Tabla 4. Clasificación del suelo debido a su valor de pH	...36
Tabla 5. Clasificación de suelos de acuerdo a la cantidad de N total	...40
Tabla 6. Clasificación del suelo de acuerdo al contenido de N inorgánico	...41
Tabla 7. Clasificación de suelos de acuerdo a la cantidad de materia orgánica	...42
Tabla 8. Clasificación del suelo de acuerdo al contenido de fósforo	...44
Tabla 9. Puntos de muestreo para los sistemas con <i>P. chrysosporium</i>	...54
Tabla 10. Puntos de muestreo para los sistemas con <i>P. cinnabarinus</i>	...54
Tabla 11. Diseño de experimentos factorial	...63
Tabla 12. Sistemas utilizados como testigos en la experimentación	...64
Tabla 13. Tratamientos aplicados para la degradación de hidrocarburos con el hongo <i>P. chrysosporium</i>	...64
Tabla 14. Tratamientos aplicados para la degradación de hidrocarburos con el hongo <i>P. cinnabarinus</i>	...64
Tabla 15. Valores obtenidos de la caracterización del suelo	...67
Tabla 16. Contenido de hidrocarburos en la muestra uno	...71
Tabla 17. Contenido de hidrocarburos en la muestra dos	...71
Tabla 18. Contenido de hidrocarburos totales fracción pesada en los diferentes sistemas durante las pruebas de degradación	...72
Tabla 19. Actividad de la Lacasa en los diferentes tratamientos	...75
Tabla 20. Actividad de la Manganese Peroxidasa en los diferentes tratamientos	...77
Tabla 21. Actividad de la Lignina peroxidasa en los diferentes tratamientos	...79
Tabla 22. Relación entre los sistemas y las diferentes actividades enzimáticas	...81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa que muestra la distribución de las diferentes instalaciones petroleras en México	...2
Figura 2. Ecosistema contaminado con hidrocarburos	...3
Figura 3. Subregiones productivas de Tabasco, La Chontalpa se muestra en verde oscuro; el Centro, en color azul; la Sierra, en color verde claro; los Pantanos, en color naranja, y los Ríos, en color rojo	...5
Figura 4. Tipos de estructuras químicas de los componentes del petróleo	...7
Figura 5. Representación esquemática de los procesos de degradación de hidrocarburos	...11
Figura 6. Composición y estructura química de la lignina	...17
Figura 7. Ciclo de la Lignina peroxidasa	...18
Figura 8. Ciclo de la Manganese peroxidasa	...18
Figura 9. A. Ciclo catalítico de las lacasas. B. Ciclo catalítico lacasa-mediador	...19
Figura 10. Cultivo en caja Petri de <i>P. chrysosporium</i>	...21
Figura 11. Cultivo en caja Petri de <i>P. cinnabarinus</i>	...22
Figura 12. Tomas clandestinas en ductos	...28
Figura 13. Mapa que muestra las zonas afectadas por la fuga en el oleoducto Agave-Sitio Grande en el Estado de Tabasco	...29
Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología.	...33
Figura 15. Imagen satelital de la localización del pozo terra y la zona de muestreo	...35
Figura 16. Sitio de muestreo, la parte amarilla consiste en la zona 1 y donde se aprecia contaminación, la zona 2	...36
Figura 17. Medición del pH de las muestras	...37
Figura 18. Equipo para determinar humedad por el método de Dean-Stark	...38
Figura 19. Digestión de las muestras de suelo en matraces Kjeldahl	...39
Figura 20. Destilación del digerido en microdestilador	...39
Figura 21. Prueba de retención de agua	...43
Figura 22. Extracción de hidrocarburos con el equipo Soxhlet a nivel microescala	...45
Figura 23. Cultivos en agar inclinado de los hongos <i>P. cinnabarinus</i> y <i>P. chrysosporium</i>	...47
Figura 24. Cultivos en botella Roux, <i>P. chrysosporium</i> y <i>P. cinnabarinus</i>	...48
Figura 25. Soportes en recipientes de vidrio rectangular, piña y madera	...49

Figura 26. Soporte inoculado con <i>P. cinnabarinus</i> contaminado, piña y madera	...49
Figura 27. Soportes en botellas de vidrio, olote y madera	...50
Figura 28. Soporte de olote recién inoculado y colocado en horizontal para asegurar mayor contacto del hongo y el inóculo	...50
Figura 29. <i>P. chrysosporium</i> inmovilizado y colocado en los recipientes rectangulares al momento de iniciar las pruebas de degradación, a la izquierda olote y a la derecha madera	...51
Figura 30. <i>P. cinnabarinus</i> inmovilizado y colocado en los recipientes rectangulares al momento de iniciar las pruebas de degradación, a la izquierda olote y a la derecha madera	...51
Figura 31. Sistemas de degradación de hidrocarburos en suelo, <i>P. chrysosporium</i> inmovilizado en olote e inmovilizado en madera	...52
Figura 32. División en cuadrantes de los sistemas de degradación	...53
Figura 33. Vista del Pozo Terra 123	...66
Figura 34. Crecimiento de <i>P. chrysosporium</i> sobre el olote	...68
Figura 35. Crecimiento de <i>P. chrysosporium</i> sobre la madera	...69
Figura 36. Evolución del suelo inoculado con <i>P. chrysosporium</i> sin inmovilizar	...69
Figura 37. Crecimiento de <i>P. cinnabarinus</i> sobre el olote	...69
Figura 38. Crecimiento de <i>P. cinnabarinus</i> sobre la madera	...70
Figura 39. Soporte inoculado con <i>P. chrysosporium</i> , olote y madera	...70
Figura 40. Gráfica que muestra el contenido de hidrocarburos al finalizar las pruebas de degradación.	...73
Figura 41. <i>P. chrysosporium</i> inmovilizado en olote, las flechas destacan la invasión del suelo a la derecha se observan las paredes y la invasión del hongo en el suelo	...73
Figura 42. Gráfica que muestra el porcentaje de remoción de hidrocarburos en los tratamientos	...74
Figura 43. Gráfica que muestra el comportamiento de la Lacasa a través del tiempo en cada tratamiento	...76
Figura 44. Gráfica que muestra el comportamiento de la Manganese Peroxidasa a través del tiempo en cada tratamiento	...78
Figura 45. Gráfica que muestra el comportamiento de la Lignina Peroxidasa a través del tiempo en cada tratamiento	...80

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CINVESTAV	Centro de Investigación y Estudios Avanzados
CONAFOR	Comisión Nacional Forestal
g	gramos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPN	Instituto Politécnico Nacional
Kg	Kilogramos
Lac	Lacasa
LiP	Lignina Peroxidasa
MnP	Manganeso Peroxidasa
M	Molar/Molaridad
mg	miligramos
mL	mililitros
mM	milimol
N	Normal/Normalidad
nm	nanómetros
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
<i>Pc</i>	<i>Pycnopus cinnabarinus</i>
PDA	Agar Dextrosa Papa
PEMEX	Petróleos Mexicanos
<i>Ph</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
ppm	partes por millón
SEMARNAT	Secretaría Medio Ambiente y Recursos Naturales
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
μL	microlitro
μmol	micromol

RESUMEN

En México la presencia de hidrocarburos en suelo es un tipo de contaminación común y que actualmente es tratada principalmente mediante métodos fisicoquímicos. Esta tesis comprende el desarrollo de un método biotecnológico para restaurar los suelos contaminados con hidrocarburos, el cual consiste en su biodegradación utilizando dos hongos ligninolíticos inmovilizados en soportes orgánicos. Para llevar a cabo las pruebas de degradación se seleccionaron los hongos basidiomicetos, *Phanerochaete chrysosporium* y *Picnoporus cinnabarinus*, los cuales fueron inmovilizados en dos soportes, olote de maíz y madera. La inmovilización de los hongos se realizó favoreciendo su desarrollo sobre los soportes durante tres semanas, posteriormente ambos hongos inmovilizados se mezclaron con el suelo contaminado en una proporción de 200 gramos de soporte por cada kilogramo de suelo contaminado. En las unidades de experimentación se determinaron las actividades de las enzimas Lignina Peroxidasa (*LiP*), Manganese Peroxidasa (*MnP*) y Lacasa (*Lac*) y se relacionaron con el porcentaje de degradación de hidrocarburos obtenidos en cada caso.

En el sistema del hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote se presentó la mayor actividad de la enzima *MnP*, por lo que se puede relacionar con el porcentaje alto de degradación de hidrocarburos a la semana seis. En este sistema y a ese tiempo de incubación, se presentó el mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos, que fue del 72.7%. Para el sistema del hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote, la enzima que mostró más actividad fue la *Lac*, seguida por la actividad de la *MnP*, y con una actividad más baja se presentó la *LiP* en la semana seis. En este sistema y a ese tiempo de incubación, se presentó un porcentaje de degradación de hidrocarburos del 62.2 %.

ABSTRACT

In Mexico the presence of hydrocarbons in soil is a common type of pollution and is currently treated mainly by physicochemical methods. This thesis includes the development of a biotechnological method to restore soils contaminated with hydrocarbons, which consists of their biodegradation using two ligninolytic fungi immobilized in organic supports. In order to carry out the tests of degradation were selected the basidiomycete fungi, *Phanerochaete chrysosporium* and *Picnoporus cinnabarinus*, which were immobilized in two supports, corn cob and wood. Immobilization of the fungi was performed favoring their development on the supports for three weeks, then both immobilized fungi were mixed with the contaminated soil at a rate of 200 grams of support per kilogram of contaminated soil. In the experimental units the activities of the enzymes Lignin Peroxidase (*LiP*), Manganese Peroxidase (*MnP*) and Lacasa (*Lac*) were determined and related to the percentage of hydrocarbons degradation obtained in each case. In the system of the fungus *P. chrysosporium* immobilized in corn cob the greater activity of the enzyme *MnP* was presented, reason why it can be related to the high percentage of degradation of hydrocarbons at week six. In this system and at that incubation time, the highest percentage of hydrocarbon degradation was presented, which was 72.7%. For the *P. cinnabarinus* fungus system immobilized in corn cob, the enzyme that showed the most activity was *Lac*, followed by the activity of *MnP*, and with a lower activity *LiP* was present in the week six. In this system and at that incubation time, the percentage of hydrocarbons degradation was of 62.2%.

1 INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Una actividad que ha representado un alto ingreso económico a México es la producción petrolera, la cual incluye con la explotación, su refinación y la obtención de sus diferentes derivados, una amplia gama de actividades económicas. Existen diversos usos para los derivados del petróleo, siendo uno de los más importantes el de la producción de combustibles, ya que se usan principalmente como fuente generadora de calor para producir otro tipo de energía (PEMEX, 2013).

Debido al desarrollo y expansión de la industria petroquímica (Figura 1) se han suscitado diferentes problemas ambientales, los cuales provienen primeramente de la generación de residuos peligrosos y en segundo lugar de las emergencias ambientales, básicamente fugas y derrames, los cuales provocan serios daños a los ecosistemas aledaños, ya sean acuáticos y/o terrestres. En el año de 2012 PEMEX reportó 251 derrames en diferentes zonas de México, derramando 2,123 toneladas de varios tipos de hidrocarburos (PEMEX, 2013).



Figura 1. Mapa que muestra la distribución de las diferentes instalaciones petroleras en México (PEMEX, 2013)

Los hidrocarburos son los compuestos más importantes en la constitución del petróleo, y pueden tener diferentes estructuras químicas (Baird y Cann, 2014; Brown y Poon, 2012), por lo que pueden clasificarse como sigue:

HIDROCARBUROS SATURADOS: alcanos (lineales y ramificados) y cicloalcanos.

HIDROCARBUROS AROMÁTICOS: monocíclicos (benceno), bicíclicos (naftaleno), tricíclicos (antraceno y fenantreno) y policíclicos (pireno y benzo[a]pireno).

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares o policíclicos (*PAH*, por sus siglas en inglés) son altamente inestables y provocan severos daños tanto a los seres vivos como al ambiente. El principal efecto negativo producido a los seres vivos es la generación de varios tipos de cáncer. Por ejemplo, los PAH tales como benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno han causado tumores en los animales de laboratorio que han respirado estas sustancias en el aire, que las han consumido en alimentos contaminados o que han entrado en contacto a través de la piel durante largos periodos de tiempo. Los estudios realizados en personas demuestran que las que son expuestas a través de la respiración o al contacto con la piel durante largos periodos de tiempo con mezclas que contienen PAH pueden contraer cáncer, también provocan problemas reproductivos, así como defectos congénitos y disminución del peso corporal. (Baird y Cann, 2014; ATSDR, 2016).

Con respecto a los daños que provocan los *PAH* en los suelos, el agua y el aire, Baird y Cann (2014) y Pons *et al.* (2011) comentan lo siguiente:

- En suelos: la principal preocupación es la contaminación de suelos agrícolas, donde se ve comprometida su fertilidad (Figura 2).
- En agua: porque se unen a los sedimentos, fomentando la eutrofización de los cuerpos de agua naturales y por bioacumulación provocan la muerte por intoxicación de crustáceos y peces.
- En aire: se adsorben en partículas de tamaño submicrométrico, lo que provoca que lleguen hasta los pulmones, degradando de manera significativa la calidad de vida de las personas, principalmente en las ciudades industrializadas.



Figura 2. Ecosistema contaminado con hidrocarburos (Villegas, 2015)

Importancia del suelo

El suelo es una parte elemental del ambiente, su definición depende del interés que se tenga en él; desde la perspectiva agrícola el suelo es la capa de materia orgánica que recubre la superficie terrestre y es explotada por las plantas para obtener nutrientes y agua.

En México interactúan una amplia gama de suelos que puede ser explicada por la interacción de diversos factores, entre los cuales se encuentran la topografía originada por la actividad volcánica, el gradiente altitudinal, la existencia de cuatro de los cinco grandes tipos de climas y la enorme diversidad paisajística y de tipos de minerales que existen en el territorio (SEMARNAT, 2003).

De las funciones que tiene el suelo en el ambiente, las más destacables son las siguientes, mencionadas por Juárez (2014):

- Sirve como hábitat de la fauna.
- Es un recurso no renovable.
- Sirve como soporte para el desarrollo de la flora.
- Es una parte fundamental en los ciclos biogeoquímicos presentes en la tierra.

Es por estas características que el mantenimiento del estado original del suelo es de vital importancia, por lo que es importante determinar el tipo de suelo y el tipo de actividad económica que se lleva a cabo en él para poder determinar las causas de la contaminación y degradación (Juárez, 2014).

Suelos del estado de Tabasco

El estado de Tabasco se sitúa al sureste de la República Mexicana, cuenta con una superficie total de: 2'466,100 hectáreas que representan el 1.38% de la superficie total del país. Cuenta con 17 municipios y gran densidad de cuerpos de agua y corrientes superficiales. Se encuentra formado por llanuras bajas y húmedas principalmente (INEGI, 2016; SEMARNAT, 2013).

Se cuenta con dos tipos de regionalización del estado, la económica y la productiva. La división en regiones productivas agrupa a los municipios con características geográficas y productivas similares. Así los 17 municipios de la entidad están agrupados en cinco regiones (Figura 3) (CONAFOR, 2015).



Figura 3. Subregiones productivas de Tabasco: La Chontalpa se muestra en verde oscuro; El centro en color azul; La Sierra en color verde claro; Los Pantanos en color naranja, y Los Ríos en color rojo (CONAFOR, 2015)

Una de las más importantes es la subregión de La Chontalpa, la cual se localiza en la parte más occidental del estado. Los municipios que la integran son: Huimanguillo, Cárdenas, Comalcalco, Paraíso y Cunduacán. Es la sub región más occidental del estado y la que concentra el mayor número de habitantes (INEGI, 2016; CONAFOR, 2015).

Características y uso de suelo de “La Chontalpa”

El terreno es mayormente plano con escasas elevaciones de poca importancia en los municipios de Cárdenas y Comalcalco. En la parte sur del municipio de Huimanguillo en las estribaciones de la Sierra Madre del Sur es donde se localizan las mayores elevaciones de esta subregión (INEGI, 2016; CONAFOR, 2015; SEMARNAT, 2013). Las actividades económicas desarrolladas en esta región son:

Petrolera: en el municipio de Paraíso se encuentra el puerto petrolero de Dos Bocas, en el municipio de Huimanguillo se localiza el Complejo Procesador de Gas de La Venta y en todos los municipios de esta subregión existen cientos de pozos productores.

Agricultura: es el principal productor de cacao, caña de azúcar, piña, limón y naranja, también cuenta con tres ingenios azucareros.

Ganadería: se cuenta con bastos campos ganaderos, siendo la principal la explotación de ganado bovino de la especie cebú.

Turismo: cuenta con dos zonas arqueológicas muy importantes, La Venta (centro ceremonial Olmeca) y Comalcalco (ciudad maya construida de ladrillo cocido). Además de que están las playas del municipio de Paraíso, mientras que en Huimanguillo se localiza la zona arqueológica de Malpasito y el centro ecoturístico de Agua Selva.

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2016) en la subregión de La Chontalpa, Tabasco, se reportan los siguientes tipos de suelos:

Vertisol Éutrico: cubre el 38% de la zona, son suelos que tienen 30% o más de arcilla, son limitados por manto freático elevado y tienen lenta permeabilidad. Los cultivos que se desarrollan son pastizales, caña, cacao y plátano.

Fluvisol: cubre el 19.5% de la región. Se distribuye a los márgenes de la vega de los ríos que no tienen riesgos de inundación. Los usos son agrícolas, pastizales y cultivos maderables además de cultivos de temporal con control de agua.

Vertisol Crómico: cubre el 9.9% de la zona, se distribuyen en las zonas costeras. Son suelos de color rojizo originados por el proceso de oxidación del hierro.

Histosol: ocupa el 7.7% de la región. Su característica principal es la acumulación de materia orgánica en diferentes estados de descomposición. Con drenaje muy pobre o nulo, estos suelos se encuentran en gran parte de los “bajiales”, su vegetación es de tipo hidrófita.

El petróleo es un combustible compuesto principalmente por hidrocarburos, los cuales pueden tener diferentes estructuras químicas, y compuestos polares, como azufre, nitrógeno, y algunos metales, los que son considerados como impurezas (Figura 4). En condiciones normales de presión y temperatura es un líquido que puede presentar gran variación en diversos parámetros como color y viscosidad (desde amarillentos y poco viscosos como la gasolina hasta líquidos negros tan viscosos que apenas fluyen), densidad (entre 0.66 g/mL y 0.9785 g/mL), capacidad calorífica, entre otros. Estas variaciones se deben a la diversidad de concentraciones de los hidrocarburos y los componentes polares que componen la mezcla (Baird y Cann, 2014; Brown y Poon, 2012).

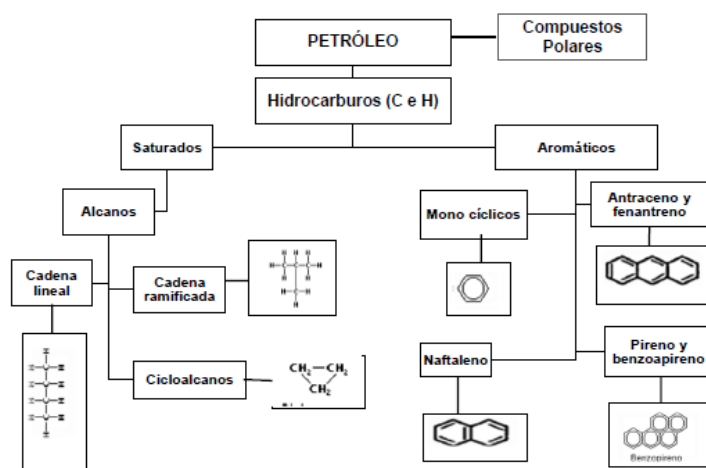


Figura 4. Tipos de estructuras químicas de los componentes del petróleo

Los *PAH* son altamente inestables y provocan severos daños tanto a los seres vivos como al ambiente.

En los seres vivos los efectos producidos van desde una intoxicación hasta la producción de cáncer, si bien las moléculas de *PAH* no son agentes cancerígenos por si solos, por medio de varias reacciones metabólicas llevadas a cabo en el organismo se producen cationes muy estables que inducen al cáncer (Baird y Cann, 2014). En el medio ambiente tienen varias repercusiones, en el caso del suelo puede disminuir su fertilidad al perder nutrientes o también pueden contaminar los cultivos, lo cual representaría una pérdida posterior de la fertilidad; en el agua se deposita en los sedimentos, causando una intoxicación a la fauna de los cuerpos de agua donde hubo la contaminación y en el aire, en la deposición de pequeñas partículas en el aparato respiratorio de la fauna (Baird y Cann, 2014).

En México la industria petrolera ha tenido un crecimiento exponencial, en el área de extracción principalmente. Debido a los malos mantenimientos de las tuberías y a que estas pasan por zonas deshabitadas, el robo de combustible es un problema común, que trae consigo la contaminación de los ecosistemas aledaños, esto sucede primeramente por escorrentía en la superficie del suelo para posteriormente ir penetrando a las capas del suelo, siendo arrastrados por el agua y en ocasiones siendo detenidos por el tipo de suelo, que puede adsorberlo en su superficie.

Debido a esto se han establecido diferentes normas que buscan proteger y establecer los límites de contaminantes que pueden estar presentes en el ambiente. En el caso del suelo las normas vigentes utilizadas son la NOM-021-RECNAT-2000 que establece los métodos para caracterizar el suelo y la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos (Tabla 1).

Tabla 1. *Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo*

Fracción de hidrocarburos	Uso del suelo predominante (ppm)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1,200	1,200	5,000
Pesada	3,000	3,000	6,000

Técnicas empleadas para remover hidrocarburos del suelo

Existen diferentes tecnologías para poder remover del suelo contaminantes derivados del petróleo; la selección de cualquiera de ellos depende principalmente de las características físico-químicas del contaminante, del desarrollo del método y de su costo. Hay tratamientos químicos como la extracción con solventes utilizando el método de Soxhlet, el método de extracción-agitación-centrifugación y el método de oxidación de Fenton (Usman *et al.*, 2012). Por otro lado, también se aplican tratamientos biológicos, los cuales han tenido un avanzado desarrollo en los últimos años. Cada uno de los métodos anteriores, tienen ventajas, desventajas y características propias que hacen que su uso no sea del todo recomendado para cualquier zona, o bien que se haga necesario utilizar una combinación de ellos para llegar a resultados aceptables en cada caso. En la tabla 2 se resumen las diferentes técnicas más utilizadas (Teutli *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2010; Ming *et al.*, 2005; Saichek y Reddy, 2005; Pons *et al.*, 2011).

Tabla 2. Técnicas empleadas en la restauración de suelos

Técnica	Variantes
Extracción con solventes	Soxhlet, extracción presurizada, auxiliada por vapor
Solidificación	Polimerización, precipitación, surfactantes
Lavado de suelos	Vapor/agua caliente, agentes tensoactivos
Calentamiento	Radio frecuencia, corriente directa
Agentes oxidantes	Método Fenton, <i>in situ</i> , <i>ex situ</i>
Vitrificación	Encapsulación
Electrocinética	Potenciostática, surfactante-electrocinética
Degradación microbiana	Aerobia, anaerobia, bioestimulación, bioaumentación, bioatenuación

Biorremediación

La biorremediación es la técnica que se basa en la capacidad de los microorganismos para utilizar a los contaminantes como nutrientes y de esta manera propiciar su transformación a sustancias menos tóxicas o inocuas. La efectividad de la biodegradación de los contaminantes en suelo depende de varios factores, entre los más importantes se encuentran los que se describen a continuación (Díaz, 2004; Pecingina y Cirtiña, 2013; Popa y Calinoiu, 2012; Romaniuk *et al.*, 2007):

- Sensibilidad de los contaminantes: se refiere a qué tan sensibles son los compuestos del contaminante para ser degradados por la acción de los microorganismos. Mientras más sencilla sea la estructura química del contaminante más fácil será su degradación. Hay que tener en cuenta que debe existir una afinidad del microorganismo por el contaminante.
- Tipo de microorganismo: si se trata de un hongo, alga o bacteria, dependiendo de las características químicas del contaminante. Existen también microorganismos nativos de la zona, los cuales al adaptarse al ambiente contaminado pueden estar ya realizando la descontaminación del suelo.
- Agente oxidante y nutrientes: se refiere a los minerales y nutrientes esenciales que necesitan los microorganismos para crecer, además del tipo de metabolismo que presenten para desarrollar su actividad biológica. Se considera que una relación óptima de carbono-nitrógeno-fósforo (C:N:P) debe estar alrededor de 100:10:1, para tener una buena actividad metabólica. En el caso del oxígeno, su presencia afecta directamente a la actividad del microorganismo, ya que el proceso puede ser aerobio o anaerobio.
- Características del suelo: el suelo es la parte donde se encuentran en contacto el microorganismo y el contaminante, por lo que debe mantenerse en un estado viable para los microorganismos. Las características más notables son:

Temperatura y pH: ambos parámetros deben permanecer dentro de un rango óptimo para el crecimiento de los microorganismos y aumentar la efectividad de remoción, por ejemplo, el pH influye en la solubilidad y disposición de varios nutrientes; su valor óptimo generalmente está en el rango de 5.5 a 8.5.

Materia orgánica: ya que su contenido está íntimamente relacionada con los nutrientes.

Nitrógeno: tanto nitrógeno total como nitrógeno inorgánico son fundamentales como nutrientes para los microorganismos.

Humedad: permite el correcto crecimiento de los microorganismos, además de que la biodisponibilidad del contaminante se ve afectada por la cantidad de agua que se encuentra en el suelo.

Fósforo: otro de los nutrientes importantes para el crecimiento de los microorganismos.

Características de la biorremediación

Los microorganismos tienen diversas maneras de actuar para poder degradar a los hidrocarburos, todas basadas en su capacidad metabólica, pero su actividad finalmente termina por mineralizar, oxidar o inmovilizar al contaminante (Pecingina y Cirtiña, 2013; Díaz, 2004) (Figura 5).

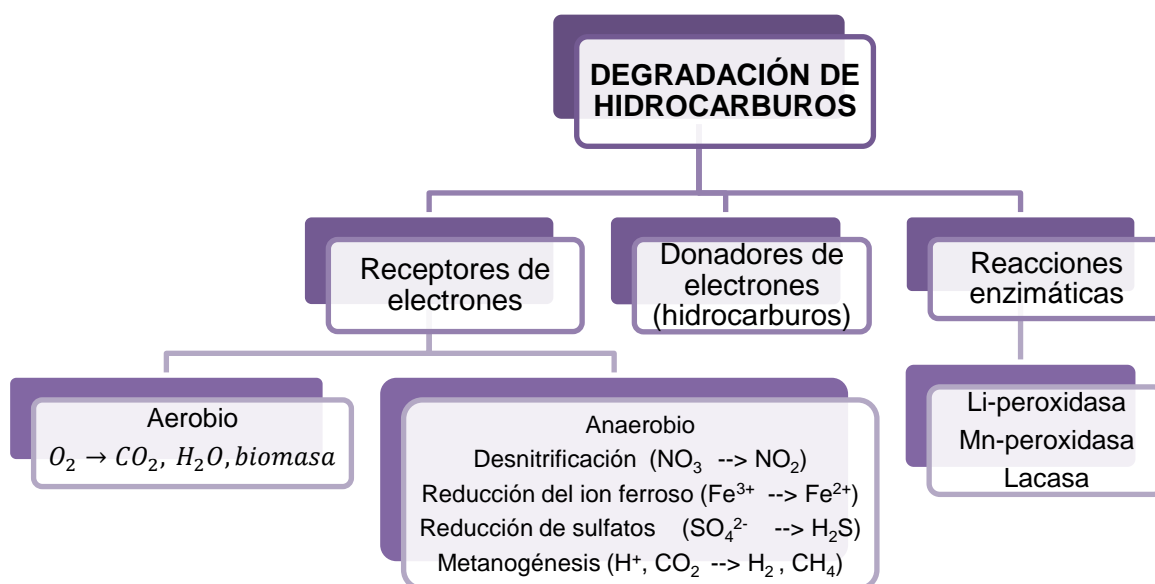
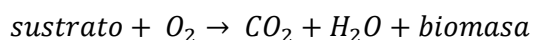


Figura 5. Representación esquemática de los procesos de degradación de hidrocarburos (Elaboración propia)

Las rutas metabólicas usadas para llegar a la mineralización del contaminante dependen de si se trata de un microorganismo aerobio o anaerobio. En el caso del metabolismo aerobio se tiene la siguiente reacción global:



El microorganismo utiliza el sustrato, lo descarboxila mediante el ciclo de Krebs transformándolo a CO_2 . Los electrones que son liberados al oxidarse el sustrato son acarreados hasta el oxígeno por las coenzimas reducidas, y así se obtiene agua, biomasa y CO_2 .

Existen hongos ligninolíticos, los cuales pueden llevar a cabo distintas rutas metabólicas, utilizando enzimas no específicas tales como: la lignina-peroxidasa (*LiP*), la peroxidasa dependiente de manganeso (*MnP*) y la lacasa (*Lac*). Estas enzimas sirven para convertir el sustrato en un producto más simple que se puede aprovechar y utilizar más fácilmente (Lucas, 2001).

Los procesos de biorremediación del suelo pueden ser tipificados de varias maneras dependiendo de sus características, por ejemplo, existen métodos *in situ* y métodos *ex situ*, con base en la ubicación en donde se realiza el tratamiento del suelo contaminado (Benavides *et al.*, 2006; Popa y Calinoiu, 2012).

Los tratamientos *in situ*, no requieren excavación del suelo contaminado, esto es que se hacen a nivel del suelo y directamente en el sitio afectado por la contaminación. La biorremediación *in situ* es la más aplicada debido a su bajo costo, ya que no requiere movilizar la tierra y generalmente utiliza microorganismos nativos presentes en el suelo, por lo que está altamente recomendada para grandes extensiones de terreno. Dentro de los mismos tratamientos *in situ*, existen sistemas activos y sistemas pasivos, pero en ambos se proporcionan nutrientes y oxígeno al suelo, mediante una solución acuosa, con el fin de ayudar al sistema a tener una mayor área de contacto, siendo la diferencia en que en el caso de los sistemas activos la solución acuosa se recircula, y en el otro tipo de tratamiento, no.

A continuación se explican brevemente algunos tratamientos *in situ*:

- **Bioatenuación:** técnica basada en el potencial de un suelo para conseguir su restauración de manera natural y es una propuesta costo-efectiva óptima de bajo riesgo.
- **Bioventilación:** tecnología basada en la inyección de aire y nutrientes para estimular la movilización de los compuestos volátiles y ayudar a la degradación aerobia de contaminantes. Los factores determinantes de esta técnica son una baja aireación, una alta saturación de agua y una baja temperatura.
- **Bioburbujeo:** consiste en una inyección de aire mediante capilares, movilizandolos contaminantes a la superficie, pudiéndose también inyectar algún solvente, como peróxido, compuestos halogenados o iones metálicos, lográndose así, la inmovilización de los contaminantes.
- **Bioestimulación:** consiste en la estimulación de la actividad microbiana con el movimiento de agua, junto con un inóculo optimizado, que puede usarse para procesos aerobios y anaerobios. Es la adición de nutrientes a fin de estimular el crecimiento o aumentar el metabolismo degradativo de los microorganismos nativos. Estos nutrientes pueden ser añadidos en solución acuosa o directamente al suelo.
- **Bioaugmentación:** es el uso de cepas o consorcios de microorganismos con ciertos atributos, tales como una alta actividad degradativa comprobada, a fin de oxidar a los contaminantes, esto es importante cuando existen microorganismos nativos que han demostrado ser los más efectivos para degradar los contaminantes, pero se encuentran en cantidades pequeñas que no les permiten tener la capacidad para degradar un contaminante en específico o su metabolismo puede estar inactivo.

Por otro lado, los tratamientos *ex situ* son métodos donde se excava el suelo y se maneja en un sistema controlado como algún tipo de biorreactor, con el fin de promover la biodegradación aeróbica (Olguín *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011; Romaniuk *et al.*, 2007; Agarry *et al.*, 2010). Los métodos *ex situ* más utilizados son:

- *Composteo (estático o con agitación)*: es la más antigua y simple de las técnicas; el suelo contaminado es removido y mezclado con suelo nutrido, introduciendo aire y agua, con el fin de mejorar el metabolismo microbiano aerobio. La mezcla se mantiene en recipientes, llamados biopilas, en los cuales se deja que el proceso se lleve a cabo. Periódicamente, el sistema debe ser aireado, ya sea manual o puede usarse una agitación mecánica.
- *Parcelas agrícolas*: es el uso de las tierras contaminadas para tierra de agricultura; una vez extraída la tierra se deposita en donde se llevará a cabo la siembra, junto con fertilizantes, para aumentar el flujo de aire y así mejorar el metabolismo de los microorganismos.
- *Biopilas*: esta técnica es ampliamente usada para controlar sustancias volátiles, para evitar las pérdidas en gases y líquidos de estas sustancias, consiste en la toma de una porción (o muestra) de suelo, la cual se mantiene aislada y a condiciones constantes durante su tratamiento.

Los procesos de biorremediación suelen tener varias formas de aplicación, para propiciar el adecuado desarrollo de los microorganismos, en este sentido se pueden entender las técnicas de bioestimulación, bioaumentación y bioatenuación (Olguín *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011; Romaniuk *et al.*, 2007; Agarry *et al.*, 2010). Las principales características de cada una se presentan a continuación:

- *Bioestimulación*: consiste en la adición de nutrientes al sistema del suelo con los microorganismos nativos, a fin de estimular su crecimiento o aumentar su metabolismo degradativo. Estos nutrientes pueden ser añadidos en solución acuosa o directamente al suelo.
- *Bioaumentación*: es el uso de cultivos puros o consorcios microbianos con ciertos atributos a fin de degradar más eficientemente a los contaminantes. Dichos microorganismos suelen ser aislados e identificados en el laboratorio de investigación, a partir de suelos contaminados, por lo que se ha demostrado cuales son los más efectivos en los procesos de biodegradación. Normalmente, los organismos que logran adaptarse a la presencia del contaminante, resultan ser los más aptos, pero se encuentran en cantidades pequeñas, por lo que su capacidad degradativa no es suficiente.

- *Bioatenuación*: es el proceso natural por el cual se manifiesta el potencial de un suelo contaminado para conseguir su restauración, sin embargo, ante las cantidades tan grandes de contaminantes con las cuales constantemente se sigue afectando al ambiente, esta opción aunque es una propuesta costo-efectiva óptima de bajo riesgo, suele no ser suficiente ante la problemática ambiental que actualmente afecta al planeta.

Ventajas y desventajas de la biorremediación

Todos los métodos de remediación de suelos tienen sus ventajas, desventajas y limitaciones. Una de las principales desventajas de la mayoría de los métodos es la generación de residuos, la cual queda en segundo plano cuando se observa que el tiempo en el cual se obtienen resultados es poco. Pecingina y Cirtiña (2013) y Díaz (2004) reportaron las ventajas y desventajas más importantes para la biorremediación en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.

Ventajas

- Al ser un proceso en donde se aplican organismos vivos, se percibe como más viable de ser llevado a la práctica sin tener efectos secundarios.
- Puede ser llevado de manera puntual, lo que evita que áreas no contaminadas sean inutilizadas en el proceso.
- Los costos de operación son menores que muchos otros métodos.
- Como los productos del proceso son generalmente CO₂ y biomasa, no se presenta el problema de tener residuos que necesitan un tratamiento extra.

Desventajas

- El uso de la biorremediación está limitado a compuestos biodegradables.
- Es difícil extrapolar los resultados del nivel laboratorio a una escala mayor.
- No es recomendado usarla en suelos compactos, ya que la aireación no es la adecuada para la mayoría de los microorganismos.
- En muchas ocasiones la biorremediación es más tardada que otros métodos.

Uso de hongos ligninolíticos en la biorremediación

En los casos de suelos contaminados se recomienda para la biorremediación el uso de hongos y bacterias, si bien las bacterias han sido más ampliamente estudiadas, se ha observado que su efectividad es menor por la competencia que existe entre ellas y la microflora del lugar para obtener nutrientes del suelo, además de que no pueden degradar contaminantes de alto peso molecular. En ese sentido los hongos ligninolíticos, gracias a sus enzimas extracelulares, tienen la capacidad de utilizar otros sustratos que se encuentran en el suelo como nutrientes debido a su semejanza estructural con la lignina, por lo que resultan más efectivos para poder degradar sustancias de alto peso molecular (Baldrian, 2008; Haritash y Kaushik, 2009).

Características de los hongos ligninolíticos

Los hongos son organismos eucariotas que están presentes en el ambiente, existen hongos microscópicos y macroscópicos, saprófitos de vida libre y patógenos. Una de las clasificaciones más básicas de los hongos, es la que está basada en la forma de sus esporas sexuales, conformando las clases de: ficomicetos, ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos.

Los hongos ligninolíticos se encuentran en la familia de los basidiomicetos, los cuales, al pudrir a la madera muerta, degradan lignina y celulosa, por lo que son conocidos como hongos de pudrición de la madera, existiendo alrededor de 1,600 especies conocidas.

Una clasificación de estos hongos viene dada por el color del micelio y del residuo dejado en el huésped (Lucas, 2001):

- Hongos de pudrición blanca: son aquellos que producen residuos que tienen una estructura fibrosa o esponjosa color blanco
- Hongos de pudrición parda: tienen una estructura fibrosa, pero de color rosáceo-rojizo o café.

Enzimas ligninolíticas

Las enzimas son moléculas proteicas cuya función es la de catalizar las reacciones químicas, al igual que los catalizadores químicos su efectividad depende en gran medida de la temperatura y el pH. Estas moléculas son casi siempre específicas, esto es que una enzima solo sirve para un sustrato, pero existen otras enzimas que son no específicas, esto es que funcionan con varios sustratos, siempre que su naturaleza química sea semejante.

Existen muchos organismos capaces de producir enzimas, entre ellos están los hongos ligninolíticos. Mediante la secreción de las enzimas extracelulares *LiP*, *MnP* y *Lac*, estos hongos degradan polímeros de la madera, siendo uno de los más importantes la lignina. La lignina es un compuesto de gran tamaño y está constituido principalmente de unidades fenil-propano unidas de manera aleatoria (Figura 6). La biotransformación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos por estos hongos se debe en parte a la semejanza con la estructura química de la lignina, y por otra a que este sistema enzimático es no específico (Lucas, 2001; Gomes *et al.*, 2009).

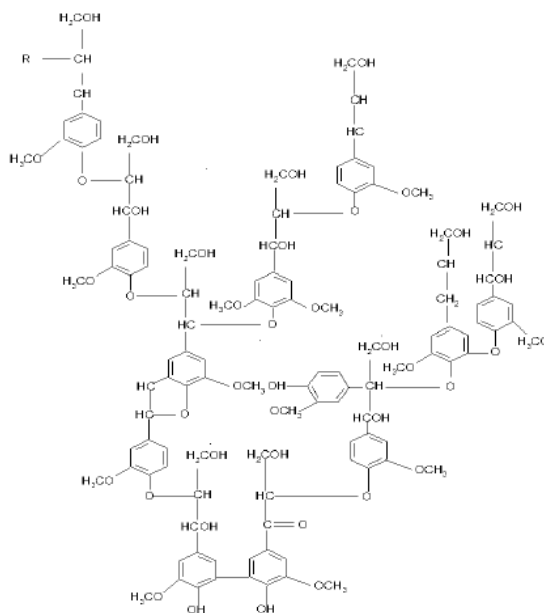


Figura 6. Composición y estructura química de la lignina (Lucas, 2001)

Lignina peroxidasa

Esta enzima es por si misma oxidativa pero también es capaz de formar radicales libres a partir de diversos compuestos orgánicos como el alcohol veratrílico (AV). Estos radicales libres son capaces de penetrar y difundirse mejor en matrices de suelo en las que la enzima en sí misma no puede, aumentando de esta manera la biodisponibilidad de nutrientes y al mismo tiempo de los contaminantes. En la figura 7 se aprecia el ciclo del funcionamiento de la *LiP*, dependiendo con qué compuesto esté en contacto y de esta manera formar los radicales libres (Quintero, 2011; Gomes *et al.*, 2009; Ikehata *et al.*, 2004).

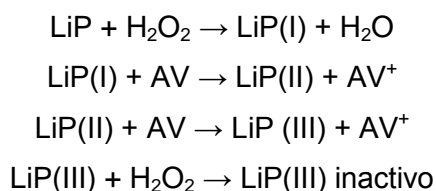


Figura 7. Ciclo de las Lignina peroxidasas (Quintero, 2011)

Manganeso peroxidasa

La acción oxidativa de esta enzima es de manera indirecta, mediante la formación de radicales Mn^{+3} provenientes del Mn^{+2} . El Mn^{+3} forma quelatos estables con ácidos carboxílicos, los cuales actúan como mediadores y generalmente son de bajo peso molecular, una vez que están presentes estos ácidos, actúan eliminando electrones e hidrógenos de manera inespecífica a moléculas orgánicas varias. En la figura 8 se observa el ciclo de la *MnP* (Quintero, 2011; Gomes *et al.*, 2009; Ikehata *et al.*, 2004).

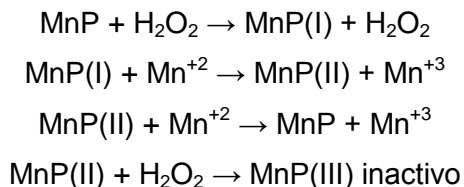


Figura 8. Ciclo de las Manganeso peroxidasas (Quintero, 2011)

Lacasa

La enzima *Lac* es una enzima oxidorreductasa que tiene como principal característica que cataliza la oxidación de sustratos fenólicos (fenol oxidasa), gracias a que son glucoproteínas que tienen cobre en su estructura, de esta manera el sustrato es oxidado y la *Lac* es reducida, produciendo agua y una *Lac* que podrá oxidar un nuevo sustrato. Las lacasas pueden atacar directamente a los sustratos o utilizar un mediador redox, que es una sustancia de bajo peso molecular y altamente inestable, que permite romper sustancias más complejas; en la figura 9 se observan ambos ciclos catalíticos (Shah y Nerud, 2002; Rodríguez, 2006; Gomes *et al.*, 2009; Ikehata *et al.*, 2004).

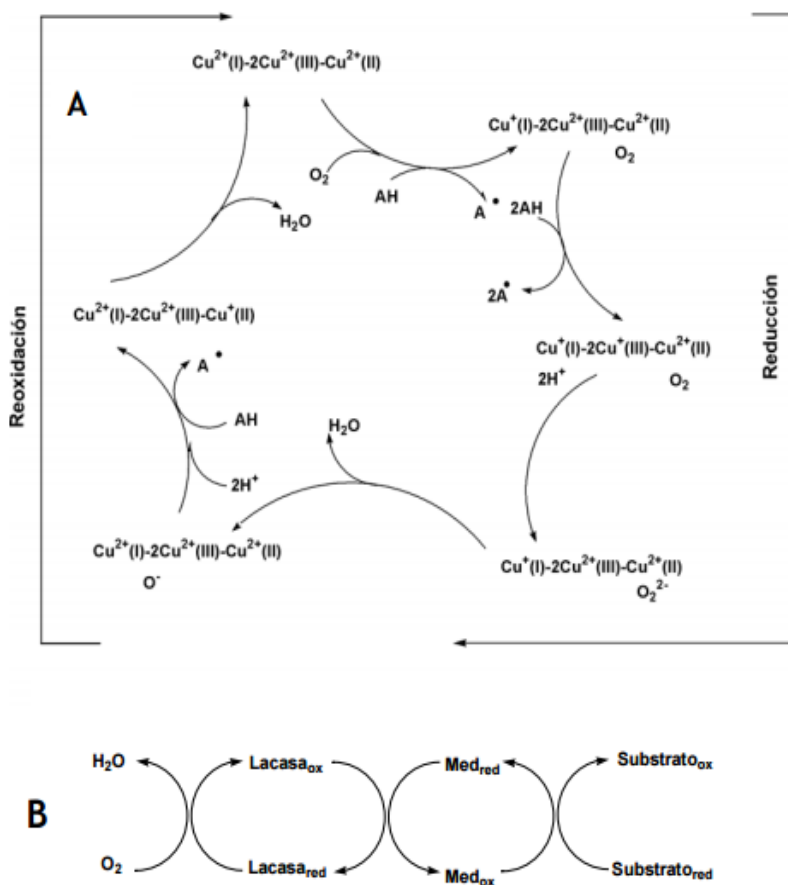


Figura 9. A). Ciclo catalítico de las lacasas. **B).** Ciclo catalítico lacasa-mediador (Rodríguez, 2006)

Hongos de vida libre e inmovilizados

Los hongos utilizados en diferentes técnicas de biorremediación pueden encontrarse de dos maneras, denominadas “de vida libre” e “inmovilizados”, cada uno de estos con ventajas y desventajas al momento de su aplicación en campo (Liang *et al.*, 2012; Zhen-Yu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

Hongos libres: estos son hongos crecidos en algún medio (ya sea nutritivo o específico), posteriormente son inoculados con alguna solución e introducidas directamente en el ecosistema contaminado, teniendo como únicos nutrientes con los que fue inoculado. Esta clase de sistemas llegan a tener inconvenientes al momento de ser llevados a la práctica, tales como baja eficiencia, baja estabilidad, poca o nula resistencia a la toxicidad de los contaminantes, estrictos valores de temperatura y pH para que se mantengan, o un aumento en el costo si es que se utilizan nutrientes extra.

Hongos inmovilizados: son hongos que son crecidos primeramente en un medio (nutritivo o específico), para ser luego puestos en soportes (inorgánicos u orgánicos) que le van a proveer al hongo de nutrientes y condiciones apropiadas de pH y oxigenación que hacen que la biorremediación tenga una mayor velocidad y por lo tanto sea un proceso más eficiente que si se encontraran libres. La elección del soporte depende por una parte del tipo de hongo a utilizar, por otra del ecosistema al cual se va a remediar (si se trata de un suelo o de un ecosistema acuoso) y por último de la naturaleza del contaminante, ya que se busca que el soporte solo interactúe con el hongo y no con el contaminante. Los soportes orgánicos tienen como principal ventaja que suelen ser desechos o residuos de otras actividades, por lo que su costo es menor que los soportes inorgánicos, y que el microorganismo lo degrada para poder obtener nutrientes, por lo que al finalizar el tratamiento no hay que remover el soporte del sistema.

El hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium*

P. chrysosporium es un hongo de podredumbre blanca, que degrada simultáneamente celulosa y lignina hasta CO_2 y H_2O , y que ha sido ampliamente utilizado debido a su poder degradativo por las actividades de las enzimas *LiP* y *MnP*, gracias a lo cual, este hongo puede degradar compuestos orgánicos como hidrocarburos, tanto en suelo como en agua (Jagjit y Khajamohiddin, 2012; Lucas, 2001; Cuiping *et al.*, 2009).

Este hongo ha sido utilizado para degradar DDT (Cruz, 2003), resultando efectivo para degradar el DDT tanto en cultivo líquido como en una muestra de suelo, alcanzando una degradación del 76% del contaminante.

También ha sido ampliamente estudiado como degradador de hidrocarburos específicos, tales como 4,4'-diclorofenilbenzo (a) pireno, entre otros (Zheng 2002; Tekere *et al.*, 2005).

Este hongo ha sido utilizado en la degradación de pireno, contrastando la actividad enzimática del hongo como la responsable de esta degradación, encontrando que a mayor actividad medida había mayor degradación de pireno (Wang, 2014).

Las características del micelio del *P. chrysosporium* desarrollado en agar extracto de malta se muestran en la figura 10.

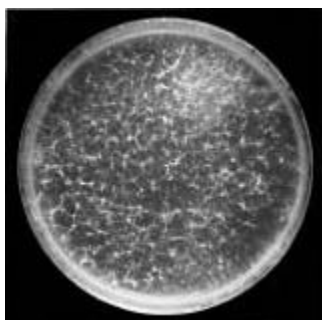


Figura 10. Cultivo en caja Petri de *P. chrysosporium* (Elaboración propia)

El hongo ligninolítico *Pycnoporus cinnabarinus*

P. cinnabarinus es un hongo de podredumbre parda que mineraliza la lignina hasta CO₂ y H₂O, para lo cual produce principalmente la enzima *Lac*. Ha sido aplicado en la degradación de compuestos tales como colorantes e hidrocarburos en medios acuosos y en suelo (Mougin *et al.*, 2002; Schliephake *et al.*, 1993; Lucas, 2001). En la figura 11 se puede observar el micelio del *P. cinnabarinus* en agar extracto de malta.

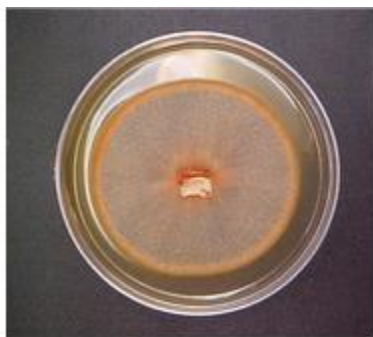


Figura 11. Cultivo en caja Petri de *P. cinnabarinus* (Elaboración propia)

Camarero *et al.* en el año 2005 y Mougin *et al.* en el 2002 mencionan que la principal enzima degradadora de compuestos xenobióticos es la *Lac*, la cual se encuentra en este hongo y que ha sido estudiada por sí misma para degradar varios tipos de compuestos, principalmente en sistemas acuáticos, pero también en algunos sistemas terrestres con contaminantes complejos tales como colorantes o hidrocarburos.

Gomes y colaboradores en el año 2009 hicieron la recolección de varios hongos basidiomicetos con el fin de verificar la decoloración de colorantes en sistemas artificiales, encontrando que uno de los más eficientes fue el *P. cinnabarinus*, el cual llegó a degradar un 60% del colorante y tuvo una alta actividad de *Lac*.

2 ANTECEDENTES



ANTECEDENTES

Las referencias consultadas coinciden en que, si bien las bacterias han sido más estudiadas, tanto en individual como en consorcio, los hongos son capaces de apoderarse del suelo y ser más eficaces al degradar sustratos (contaminantes) grandes, esto es debido a las enzimas extracelulares que secretan, las cuales son no selectivas y pueden degradar compuestos químicamente similares a la lignina. Además de que se consultaron estudios donde se contrastaban los microorganismos en vida libre e inmovilizados, con el fin de observar si era pertinente la inmovilización. Cabe recalcar que la naturaleza del suelo también es importante para la degradación del suelo.

Como primer paso Zhen-yu *et al.* (2012) compararon la degradación de hidrocarburos con microorganismos en vida libre e inmovilizados, para ello tomaron muestras de suelo, de allí obtuvieron tanto el suelo contaminado como los microorganismos a utilizar. Por una parte, identificaron los contaminantes presentes y por otra los microorganismos, los cuales fueron aislados de ese suelo, crecidos e inmovilizados. Los resultados mostraron que los microorganismos presentes en el suelo, al ser incubados y tratados de tal manera que su crecimiento fue favorecido, tuvieron un incremento en su capacidad de degradación, pero esta degradación fue menor en comparación con los mismos microorganismos inmovilizados, demostrando que la inmovilización brinda nutrientes a los microorganismos y de esta manera se facilita la degradación de los contaminantes.

Por otra parte, Wang *et al.*, en el año 2013 buscaron la remediación de suelos destinados a la agricultura, contrastando un hongo de vida libre (*P. chrysosporium*), un mineral solo (turmalina) e inmovilizando al hongo *P. chrysosporium* en la turmalina. Utilizando la relación entre la *MnP* y la degradación de los hidrocarburos, se encontró que la adición de la turmalina al hongo efectivamente estimula la degradación, haciendo que sea posible una mayor degradación en el mismo tiempo que si solo se utilizara el hongo en vida libre. Por otra parte, también se observó que la turmalina proporcionaba nutrientes que estimulaban a la flora bacteriana del suelo, pero estas bacterias no alcanzaron la misma capacidad de degradación que el hongo en vida libre, ni el hongo inmovilizado, demostrando que es más efectivo el uso de hongos, y más aún hongos inmovilizados.

Tekere *et al.* (2005) utilizaron cuatro hongos de pudrición blanca (*Trametes cingulata*, *Trametes versicolor*, *Trametes pocas* y *P. chrysosporium*) para observar su capacidad de degradación de hidrocarburos en un medio de cultivo estático, tipo *Batch*, observando que los cuatro hongos tuvieron una remoción considerable, pero el más efectivo resultó ser el *P. chrysosporium*, adicionando 2-2'azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) para llevar a cabo un cometabolismo que permitiera una mejor degradación de los hidrocarburos. Cabe aclarar que en el trabajo no se midió la capacidad enzimática de los hongos, solo se contrastó su capacidad de degradación entre sí.

Hay que recordar que en el caso de los hongos se ha demostrado que son las enzimas extracelulares las encargadas de la degradación, tal como Ding *et al.* (2008) relacionaron la excreción de enzimas con la degradación de hidrocarburos utilizando inductores para las enzimas *LiP* y *MnP*; los inductores fueron cobre, VA y tween 80. Estos inductores fueron adicionados a una solución de esporas de *P. chrysosporium*. Sus resultados demostraron primeramente que los inductores realmente estimulaban la producción de las enzimas extracelulares; en este trabajo, los autores también contrastaron la cantidad de enzimas con la degradación de hidrocarburos, demostrando de esta manera que las enzimas son las encargadas de la degradación de hidrocarburos y que cuando son estimuladas se degradan más hidrocarburos en el mismo tiempo.

Qian y Chen (2012) verificaron la acción degradativa de hidrocarburos causada por la interacción enzimática de dos diferentes hongos ligninolíticos, el *P. chrysosporium* y el *T. versicolor*. Para ello se midió la actividad enzimática de la Lac en tres puntos del sistema, el primer punto solo midió la actividad en el micelio del *P. chrysosporium*, el segundo punto en el micelio del *T. versicolor* y el último en donde ambos micelios estaban en contacto; estos hongos demostraron tener una capacidad para degradar hidrocarburos debida a la sinergia del contacto de los micelios; como comentario adicional este trabajo fue verificado en agar y no en suelo, lo cual cambia los valores nutricionales a los cuales tuvieron acceso en este caso los hongos utilizados en el estudio.

Zhang *et al.* (2015) compararon la degradación de dos hidrocarburos (Pireno y Antraceno) utilizando el hongo *Pycnoporus sanguineus*, para lo cual relacionaron la cantidad de Lac que se encontraba presente durante la degradación; encontraron que la Lac aparecía aproximadamente en el día 9, mismo día en que se apreciaba un aumento en la cantidad de biomasa, lo cual implicaría que en ese momento el hongo se encontraba en equilibrio entre crecer y producir enzimas. Al mismo tiempo los hidrocarburos remanentes dieron un decremento notable en el mismo día que hubo el incremento en la enzima, lo cual indica que las enzimas fueron las responsables de la degradación.

Wang *et al.* (2014) utilizaron el hongo *P. chrysosporium* para degradar pireno; para ello contrastaron dos características, un suelo estéril y no estéril y el uso de un suelo “envejecido”, además de verificar las actividades enzimáticas de *LiP* y *MnP*. En el día 10 del tratamiento, el hongo alcanzó un pico en la actividad enzimática, asimismo fue el momento donde hubo mayor producción de biomasa del hongo y el Pireno se encontraba en menor cantidad. Por otro lado, en el suelo no estéril se observó una mejor degradación que en el suelo estéril, debido quizás a la microflora ya existente y por último el suelo “envejecido” hizo referencia a un mayor tiempo de contaminación, donde se observó que nuevamente el suelo no estéril mostró mejor degradación que un suelo estéril.

Existen diversos factores a considerar para un proceso de biodegradación, pero uno de los más importantes está relacionado con las características fisicoquímicas del suelo. A este respecto Cuiping *et al.*, (2009) verificaron la degradación de los hidrocarburos Pireno, Fenantreno y Benzo[a]pireno en tres diferentes tipos de suelo: arcilloso, arenoso y húmico, encontrando que un aspecto de gran relevancia en el proceso es la absorción del hidrocarburo en la matriz de suelo, observando que mientras más arenoso y poroso fuera el suelo, más se absorbería el hidrocarburo, por lo que resulta ser un proceso tardado y menos eficiente. El proceso fue más eficiente en el suelo arcilloso.

3 JUSTIFICACIÓN



JUSTIFICACIÓN

México, al ser un país productor de petróleo, se enfrenta al problema de la generación de contaminación en las áreas de extracción y explotación. Uno de los estados más afectados por derrames de petróleo es el de Tabasco, donde se reportaron más de 196 derrames de hidrocarburos en los últimos 3 años (SEMARNAT, 2013; *González, 2015*). La principal causa de los derrames son fugas clandestinas en los ductos. Los medios de comunicación han mencionado algunos eventos contaminantes de los que se ha tenido conocimiento, por ejemplo, en el primer trimestre del año 2015 se encontraron 1,211 tomas clandestinas en ductos de PEMEX (Figura 12), siendo 140 los puntos de “ordeña” en el estado de Tabasco, indicando que es el estado con mayor frecuencia de fugas por entidad (Tabla 3).

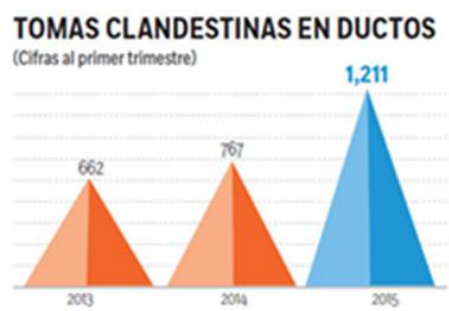


Figura 12. Tomas clandestinas en ductos (*González, 2015*)

Tabla 3. Fugas por entidad registradas en el primer trimestre (PEMEX, 2015)

Primer trimestre			
Entidad	2013	2014	2015
Veracruz	74	65	71
Sinaloa	53	60	96
Estado de México	52	47	99
Jalisco	51	53	116
Tabasco	23	33	140

El 15 de Abril de 2015 hubo un derrame en Tabasco, el cual se extendió por 20 km sobre la superficie afectando los ríos Sierra, Teapa y Grijalva, provocando el cierre de tres plantas potabilizadoras de agua y afectando una zona ganadera y agrícola. Esta fuga afectó directamente a 500,000 personas, sin considerar a las que se vieron afectadas por el consumo de los alimentos que allí se producen. En el mapa de la figura 13 se detalla la zona de la fuga, los ríos, municipios y las plantas potabilizadoras de agua afectados por el derrame.



Figura 13. Mapa que muestra las zonas afectadas por la fuga en el oleoducto Agave-Sitio Grande en el Estado de Tabasco (Villegas,2015)

Por lo anterior y por eventos similares que ocurren en la zona petrolera de Tabasco conocida como “La Chontalpa”, en este proyecto se utilizará una muestra de suelo agrícola contaminado de esta zona, problema suscitado por la explotación petrolera en México, para así proponer y desarrollar una técnica biotecnológica como lo es la biorremediación utilizando hongos filamentosos, para la remoción de hidrocarburos, siendo una opción eficaz y de un precio accesible para poder remediar suelos agrícolas que muchas veces terminan siendo aislados pero no reparados.

4

HIPOTESIS



HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

Hipótesis

Los hongos ligninolíticos producen un sistema enzimático constituido por las enzimas: *LiP*, *MnP* y *Lac*, por lo que, si se encuentran inmovilizados, se pueden asociar estas actividades enzimáticas con la degradación de hidrocarburos utilizando a los hongos *P. chrysosporium* y *P. cinnabarinus*.

Objetivo general

Demostrar la relación entre las actividades enzimáticas de los hongos ligninolíticos *P. chrysosporium* y *P. cinnabarinus* y la degradación de hidrocarburos en suelo.

Objetivos específicos

- * Experimentar con un suelo contaminado con hidrocarburos de La Chontalpa, Tabasco.
- * Emplear los hongos ligninolíticos *P. chrysosporium* y *P. cinnabarinus* en el proceso de biodegradación de hidrocarburos fracción pesada en un suelo contaminado.
- * Medir la actividad de la *MnP*, la *Lac* y la *LiP* en el suelo contaminado en presencia de los hongos inmovilizados.
- * Evaluar la remoción de hidrocarburos mediante la actividad enzimática

5

DISEÑO DE EXPERIMENTOS



DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El diseño de experimentos utilizado en este proyecto es un diseño de dos factores, bifactorial, donde las variables de respuesta son las actividades enzimáticas y la concentración final de hidrocarburos presentes en las pruebas una vez finalizadas, dicho diseño se presenta en la tabla 4.

Tabla 4 *Diseño de experimentos factorial*

TRATAMIENTO	FACTOR 1	FACTOR 2
1	+	+
2	+	+
3	+	-
4	+	-
5	-	+
6	-	+
7	-	-
8	-	-

A continuación se describe el significado de cada factor:

Factor 1: Se refiere al hongo utilizado: el hongo *P. chrysosporium* está identificado como (+) y el hongo *P. cinnabarinus* como (-). Se utilizaron los hongos por separado en los diferentes soportes.

Factor 2: Se refiere al tipo de soporte utilizado: el primer soporte fue la madera, que se identificó como (+) y el segundo soporte fue olote de maíz, identificado como (-). Ambos soportes se usaron en trozos de un tamaño de un centímetro cuadrado aproximadamente.

Tomando en cuenta estos factores se obtienen los tratamientos que se deben llevar a cabo, desde los tratamientos testigo hasta los tratamientos de experimentación propiamente.

Tratamientos Testigo: Un tratamiento testigo consistió en suelo contaminado con hidrocarburos sin presencia de hongo, y los otros testigos consistieron en suelo contaminado con hidrocarburos con alguno de los hongos en vida libre, ambos a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C de temperatura y 60% de humedad) (Tabla 5).

Tabla 5 *Sistemas utilizados como testigos en la experimentación*

TESTIGO 1	TESTIGO 2	TESTIGO 3
Suelo	Suelo con <i>P. chrysosporium</i> sin inmovilizar	Suelo con <i>P. cinnabarinus</i> sin inmovilizar

En las tablas 6 y 7 se detallan los tratamientos aplicados y los testigos, de acuerdo al hongo, utilizados durante la experimentación:

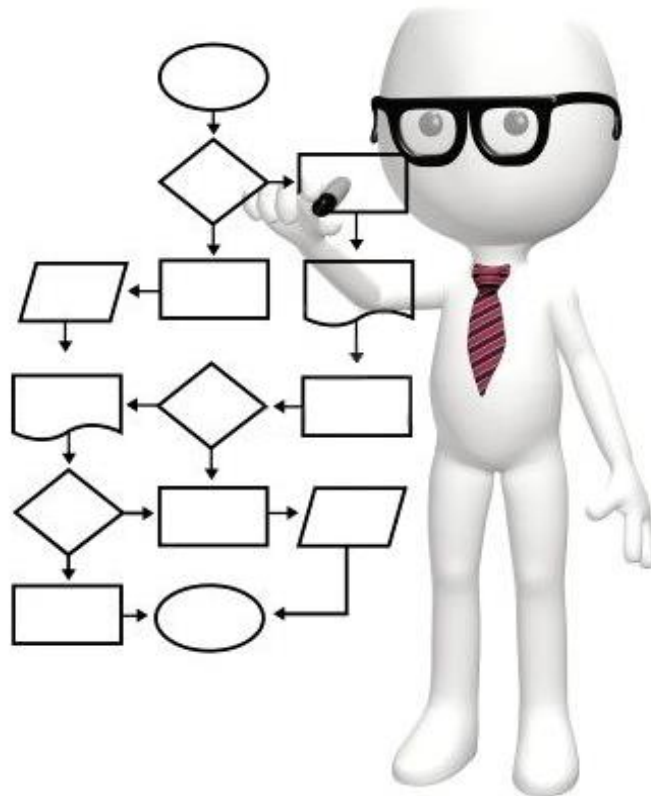
Tabla 6 *Tratamientos aplicados para la degradación de hidrocarburos con el hongo *P. chrysosporium**

TRATAMIENTO	SISTEMAS <i>Ph</i>
1 <i>Ph</i>	Suelo con <i>P. chrysosporium</i> inmovilizado en madera
2 <i>Ph</i>	Suelo con <i>P. chrysosporium</i> inmovilizado en olote
T <i>Ph</i>	Suelo con <i>P. chrysosporium</i> sin inmovilizar
Ta	Suelo sin hongo

Tabla 7 *Tratamientos aplicados para la degradación de hidrocarburos con el hongo *P. cinnabarinus**

TRATAMIENTO	SISTEMAS <i>Pc</i>
1 <i>Pc</i>	Suelo con <i>P. cinnabarinus</i> inmovilizado en madera
2 <i>Pc</i>	Suelo con <i>P. cinnabarinus</i> inmovilizado en olote
T <i>Pc</i>	Suelo con <i>P. cinnabarinus</i> sin inmovilizar
Tb	Suelo sin hongo

6 METODOLOGÍA



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la figura 14 se presenta el diagrama de flujo de la metodología experimental seguida en este proyecto.

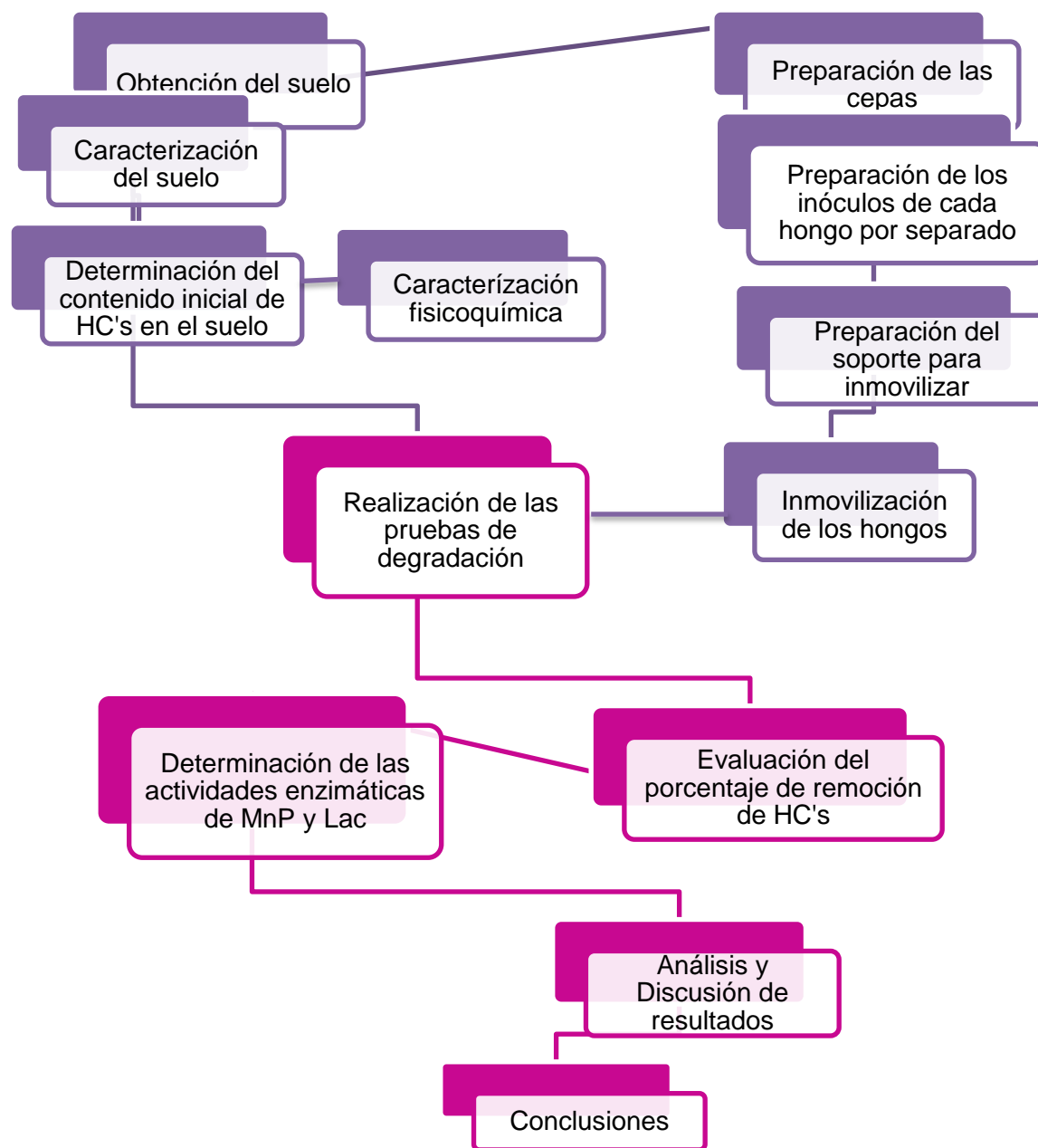


Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología

Muestreo y caracterización del suelo

La muestra de suelo utilizada en este estudio se obtuvo del Municipio de Nacajuca, Tabasco, de una zona de explotación de petróleo cercana al *Pozo Terra 123*, aproximadamente a 500 metros de distancia del pozo extractor, donde hubo una explosión accidental en el año 2013, la cual produjo la contaminación del lugar con varios tipos de residuos. Se trata de una zona agrícola que ha quedado en su mayoría en desuso ya que no hubo un oportuno y correcto saneamiento, sino que el área afectada solo fue rodeada de tierra para evitar que se esparciera, sin embargo, sigue allí el hidrocarburo a cielo abierto. En la figura 15 se observa una imagen satelital del sitio de muestreo y la localización del pozo.

El muestreo fue realizado de acuerdo a la norma NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 el día 28 de agosto de 2015, a las 10 de la mañana. Se prepararon dos muestras compuestas, cada una a partir de tres puntos seleccionados al azar. La primera muestra compuesta fue hecha con tres submuestras que se encontraban en una zona cercana al derrame donde la contaminación superficial fuera casi completa (Muestra 1) y para la otra muestra compuesta se partió de tres puntos a una distancia media entre el derrame y la barrera de contención (Muestra 2), donde aún se observaba la contaminación (Figura 16).

Para la caracterización de las muestras de suelo, se aplicaron los protocolos, marcados en la NOM-021-RECNAT-2000.

Las pruebas experimentales y los blancos fueron realizados por triplicado.

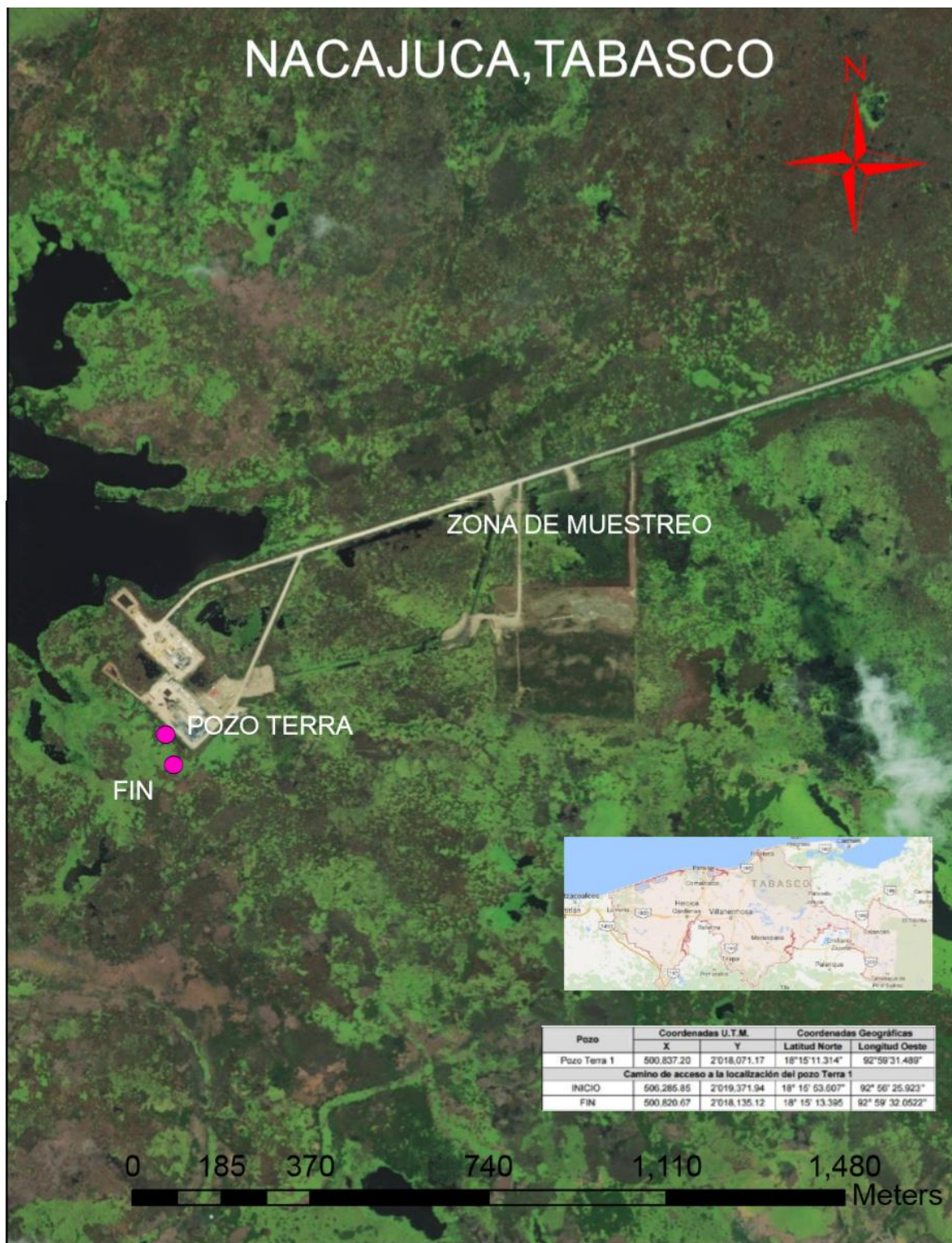


Figura 15. Imagen satelital de la localización del pozo Terra y el sitio de muestreo



Figura 16. Sitio de muestreo, la parte amarilla consiste en la zona 1 y donde se aprecia contaminación, la zona 2

pH

Para la determinación del pH de las muestras de suelo, se utilizó el método potenciométrico AS-02 marcado en la norma NOM-021-RECNAT-2000, siguiendo el siguiente procedimiento: se pesaron aproximadamente 10.0 gramos de suelo, los cuales fueron colocados en un recipiente de plástico, agregándoles 20 mL de agua destilada y agitando la mezcla cada cinco minutos hasta llegar a la media hora, para finalmente tomar la lectura del pH en ese momento. El potenciómetro utilizado fue de la Marca Hanna, modelo HI 221 que fue calibrado antes de ser utilizado con soluciones buffer de pH 4 y 6. El suelo fue clasificado de acuerdo a la tabla 8, obtenida de la norma NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 8. Clasificación del suelo debido a su valor de pH (NOM-021-RECNAT-2000)

Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

El equipo para la determinación del pH de las muestras de suelo, se muestra en la figura 17.



Figura 17. Equipo para la medición del pH de las muestras

Pérdidas al secado

Para esta determinación, se utilizó el método gravimétrico AS-05 marcado en la norma NOM-021-RECNAT-2000, mediante el siguiente procedimiento: se pesaron 5.0 g de suelo y se colocaron en charolas de aluminio para llevarlas a peso constante calentando en una estufa a 105 °C. El porcentaje de pérdidas se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Pérdidas al secado} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

Peso inicial = peso inicial de la muestra.

Peso final = peso final de la muestra.

Humedad

Para la determinación de la humedad de las muestras de suelo, se utilizó el método *Dean-Stark*, en el cual se utiliza una trampa que separa el agua de una mezcla azeotrópica, midiéndola en un tubo graduado; el procedimiento efectuado se describe a continuación: se mezclaron 10.0 g de suelo con 100.0 mL de tolueno en un matraz bola; se colocó la trampa de humedad en la boca del matraz y se conectó a un refrigerante, manteniendo el calentamiento durante tres horas y leyendo la cantidad de agua directamente de la trampa (Juárez, 2014). En la figura 18 se muestra el equipo para la realización de esta prueba.



Figura 18. Equipo para determinar humedad por el método de Dean-Stark

La ecuación utilizada para determinar la humedad fue la siguiente:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{v_{DS}}{W} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

v_{DS} = volumen de agua leído en la trampa

W = peso de la mezcla suelo/agua

Nitrógeno total

El nitrógeno total de la muestra de suelo se determinó utilizando el método AS- 25 *Kjeldahl* descrito en la norma NOM-021-RECNAT-2000, adaptándolo al nivel microescala. El procedimiento que se siguió para la determinación fue el siguiente: se pesó 1.0 g de suelo seco y se colocó en un matraz *Kjeldahl* al cual se le agregaron 5.0 mL de H_2SO_4 concentrado y 2 g de la mezcla de catalizadores K_2SO_4 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, después se procedió a realizar una digestión a temperatura media alta hasta que el digestato alcanzara un color verde azul claro (Figura 19). Al finalizar la digestión se hizo una destilación, agregando 20.0 mL de NaOH 10 N, destilando aproximadamente 30 mL, los cuales fueron recibidos en 10 mL de una solución de ácido bórico con indicadores (Figura 20).



Figura 19. Digestión de las muestras de suelo en matraces *Kjeldahl*



Figura 20. Destilación del digerido en microdestilador

La muestra fue titulada con una solución de H_2SO_4 al 0.005 N, obteniendo un vire de verde a rojo brillante y la ecuación utilizada en la determinación fue la siguiente:

$$\% N \text{ total} = \frac{14 (Vm - Vb)N}{10 w} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

Vm = volumen de ácido sulfúrico empleado en la titulación de la muestra

Vb = volumen de ácido sulfúrico empleado en la titulación del blanco

N = normalidad del ácido sulfúrico

w = peso de la muestra de suelo

El suelo fue clasificado de acuerdo a la tabla 9, obtenida de la norma NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 9. Clasificación de suelos de acuerdo a la cantidad de N total (NOM-021-RECNAT-2000)

Clase	Nitrógeno total (%)
Muy bajo	< 0.05
Bajo	0.05 – 0.10
Medio	0.10 – 0.15
Alto	0.15 – 0.25
Muy alto	> 0.25

Nitrógeno inorgánico

El nitrógeno inorgánico de la muestra de suelo se determinó utilizando el método AS-08 o *micro-Kjeldahl*, descrito en la norma de referencia NOM-021-RECNAT-2000 de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente 5.0 g de suelo seco en un recipiente de polietileno previamente lavado y enjuagado con agua regia y agua destilada para evitar interferencias. Después se agregaron 50 mL de una solución de KCl 2 N agitando por 60 minutos y filtrando. Para la destilación se agregaron 0.2 g de MgO y 0.2 g de aleación de Devarda (Al:Zn:Cu en proporción de 10:9:1). Se procedió a destilar en el microdestilador hasta obtener aproximadamente 30 mL de destilado, los cuales se recibieron en 10 mL de ácido bórico con indicadores y se procedió a titular con una solución de ácido sulfúrico 0.005 N, hasta observar un vire de verde a rosa.

La ecuación para esta determinación fue la siguiente:

$$N \text{ (ppm)} = \frac{14(Vm-Vb)N}{w} \times \frac{Vi}{a} \times 1000 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

Vm = volumen del ácido sulfúrico empleado para titular la muestra de suelo

Vb = volumen del ácido sulfúrico empleado para titular el blanco

N = normalidad del ácido sulfúrico

w = peso de la muestra de suelo seco

Vi = volumen de KCl utilizado

a = volumen de la alícuota

El suelo fue clasificado de acuerdo a la tabla 10, obtenida de la norma NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 10. Clasificación del suelo de acuerdo al contenido de N inorgánico (NOM-021-RECNAT-2000)

Clase	N inorgánico en el suelo (mg Kg ⁻¹)
Muy bajo	0 - 10
Bajo	10 – 20
Medio	20 – 40
Alto	40 – 60
Muy alto	> 60

Materia orgánica

La cantidad de la materia orgánica en la muestra se determinó de acuerdo al contenido de carbono orgánico, utilizando una oxidación y checando el residuo, de acuerdo a la norma NOM-021-RECNAT-2000, con el método AS-07. El procedimiento realizado se describe a continuación: se pesaron 0.5 g de suelo seco, se colocaron en un matraz y se agregaron 10.0 mL de una solución de $K_2Cr_2O_7$ 1 N y 20.0 mL de H_2SO_4 concentrado, girándolo para lograr una completa homogeneización, luego la mezcla se dejó reposar durante 30 minutos, después de los cuales se añadieron 200.0 mL de agua destilada, 5.0 mL de H_2PO_4 concentrado y unas gotas de difenilamina. La mezcla fue titulada con una solución de sulfato ferroso 1 M, hasta observar un vire de rosa a verde brillante. Utilizando las siguientes ecuaciones se obtuvo el porcentaje de materia orgánica:

$$\% C \text{ Orgánico} = 0.39 \left(\frac{B-T}{w} \right) N mcf \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

B = volumen de sulfato ferroso empleado para titular el blanco

T = volumen de sulfato ferroso empleado para titular las muestras

N = normalidad del sulfato ferroso

w = peso de la muestra de suelo

mcf = factor de corrección de humedad

El porcentaje de materia orgánica, se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Materia orgánica} = 1.724 \% C \text{ Orgánico} \quad \text{Ecuación 6}$$

El suelo fue clasificado de acuerdo a la tabla 11, obtenida de la norma NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 11. Clasificación de suelos de acuerdo a la cantidad de materia orgánica (NOM-021-RECNAT-2000)

Clase	Materia Orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 – 6.0	0.6 – 1.5
Medio	6.1 – 10.9	1.6 – 3.5
Alto	11.0 – 16.0	3.6 – 6.0
Muy alto	> 16.1	> 6.0

Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua se determinó de acuerdo a lo recomendado por el Instituto de Ciencias Agrarias de España (2016), de acuerdo al siguiente procedimiento: se pesaron 5.0 g de suelo seco, a los cuales se añadieron 25.0 mL de agua destilada, dejándose reposar durante 24 horas, para luego filtrarse dos veces en un embudo con papel filtro húmedo (Figura 21). El volumen del agua filtrada se midió directamente de una probeta. Los cálculos se hicieron con la siguiente ecuación:

$$CRA = \frac{\text{agua añadida} - \text{agua filtrada}}{\text{peso de la muestra}} \quad \text{Ecuación 7}$$

En unidades de mL de agua /g de suelo



Figura 21. Prueba de retención de agua

Fósforo

El contenido de fósforo en la muestra de suelo se determinó de acuerdo al método AS-10 para la determinación de fósforo aprovechable para suelos neutros y alcalinos. El procedimiento realizado fue el siguiente: se pesaron 2.5 g de suelo que fueron colocados en tubos de polietileno, a los cuales se agregaron 50.0 mL de una solución 0.5 M de NaHCO_3 , se agitaron manualmente durante 30 minutos y posteriormente fueron filtrados con papel filtro, luego se tomó una alícuota de 10.0 mL que fue colocada en un matraz aforado de 50.0 mL y se añadieron 5.0 mL de una solución reductora con ácido ascórbico, aforando y dejando reposar durante 30 minutos. Al mismo tiempo se preparó una curva de calibración con patrones de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg L^{-1} de fósforo; para ello se tomaron las siguientes cantidades de una solución de 5 mg L^{-1} de fósforo: 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mL y se colocaron en matraces aforados de 50.0 mL, y se les adicionaron 10.0 mL de una solución de NaHCO_3 0.5 M y 5.0 mL de una solución reductora de ácido ascórbico, para su aforo total. Los matraces se agitaron para leer las muestras y patrones de la curva tipo después de 30 minutos pero antes de una hora, en un intervalo de 900 hasta 800 nm (el valor exacto es 882 nm). Para los cálculos se utilizó la siguiente ecuación:

$$P(\text{mg/kg suelo}) = CC \left(\frac{V_i}{w} \right) \left(\frac{V_f}{a} \right) \quad \text{Ecuación 8}$$

Dónde:

CC = mg L^{-1} de fósforo en la solución. Esta cantidad se obtiene graficando la curva de calibración e interpolando la lectura de la muestra

V_i = volumen de la solución extractora adicionada

w = peso de la muestra de suelo seco

V_f = volumen final de la solución a leer

a = alícuota de la muestra empleada para la cuantificación

El suelo fue clasificado de acuerdo a la tabla 12, obtenida de la norma NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 12. Clasificación del suelo de acuerdo al contenido de fósforo (NOM-021-RECNAT-2000)

Clase	mg Kg^{-1} de P
Bajo	< 5.5
Medio	5.5 – 11
Alto	> 11

Hidrocarburos

Para la determinación de la concentración de hidrocarburos en la muestra de suelo, se siguieron los siguientes procedimientos:

Extracción

La extracción de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) a partir de la muestra de suelo, se realizó utilizando el método *Soxhlet* de extracción por reflujo, en su versión a microescala (Avelar, 2013), tomando como referencia los métodos de la norma NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 y de Fernandez *et. al.*, 2006. En la técnica se utilizó una mezcla de diclorometano con acetona (1:1) como disolvente para la extracción de la fracción media y hexano para la extracción de la fracción pesada. En la figura 22 se observa el equipo *Micro Soxhlet*, para esta determinación.



Figura 22. Extracción de hidrocarburos con el equipo Soxhlet a nivel microescala

Cuantificación

La determinación de los hidrocarburos de fracción media y pesada se realizó de acuerdo a la norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Debido a que se analizó la fracción pesada el método de determinación fue el gravimétrico, colocándose la muestra de hidrocarburos ya extraídos en recipientes a peso constante; para llevar las muestras a peso constante se colocaron durante dos horas a 45 °C cuando se trató de fracción media y a 70 °C si se trató de la fracción pesada, determinando la cantidad de hidrocarburos mediante la siguiente ecuación:

$$HTP's \left(\frac{mg}{kg \text{ suelo seco}} \right) = \frac{(R_b - R_a) * F_c}{P * F_h} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

R_b = peso constante en mg del recipiente con el extracto concentrado

R_a = peso constante en mg del recipiente vacío

F_c = factor de corrección

P = peso de la muestra en gramos

F_h = factor de corrección de humedad = $(1 - (\% \text{humedad} / 100))$

Acondicionamiento de las cepas

Las cepas de los hongos ligninolíticos *P. chrysosporium* y *P. cinnabarinus* que se utilizaron en el proyecto forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAM-Azcapotzalco. El hongo *P. chrysosporium* fue adquirido del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN de la Colección de Cultivos Microbianos con número de registro: CDBB-H-686.

Resiembra de las cepas

Las cepas de los dos hongos utilizados se mantuvieron viables realizando resiembras en forma oportuna, en cultivos inclinados de agar *PDA* (*Potato Dextrose Agar*) (Castañeda, 2004). En la figura 23, se muestran los cultivos en agar inclinado de las dos cepas de los hongos *P. chrysosporium* y *P. cinnabarinus*.

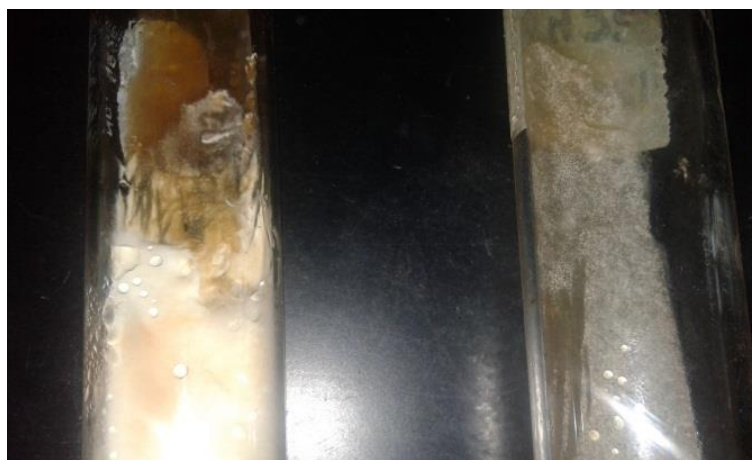


Figura 23. Cultivos en agar inclinado de los hongos *P. cinnabarinus* (izquierda) y *P. chrysosporium* (derecha)

Preparación de los inóculos

Los inóculos de las dos cepas de hongos que se utilizaron en los sistemas de degradación de hidrocarburos, se prepararon a partir de cultivos realizados en botellas Roux desarrollados en *PDA* mediante la inoculación por picadura (Castañeda, 2004), incubados a 28 °C durante 2 semanas, a partir de los cuales se obtuvo una suspensión de esporas maduras, realizando un lavado sobre la superficie del cultivo con una solución de NaCl al 0.85% estéril; a la suspensión de esporas se le determinó la viabilidad midiendo su absorbancia a 650 nanómetros; si esta es mayor o igual que 0.5 se puede garantizar que la cantidad de esporas viables es de 2.5×10^6 esporas maduras/ mL (Cruz, 2003). En la figura 24, se observa el desarrollo de los hongos en la botella Roux.



Figura 24. Cultivos en botella Roux, *P. chrysosporium* (izquierda) y *P. cinnabarinus* (derecha)

Inmovilización de las cepas

La inmovilización de las cepas de los hongos se realizó sobre dos residuos, que fueron primeramente cáscaras de piña y madera para ambos hongos *P. chrysosporium* y *P. cinnabarinus*. Debido a la presencia de un hongo oportunista que provocó la contaminación en las cáscaras de piña, se decidió sustituirlas posteriormente por olote de maíz. Los materiales seleccionados como soportes (madera y olote de maíz) se utilizaron en fragmentos de un centímetro cuadrado aproximadamente. La madera utilizada fue colectada en el Bosque de Aragón, en la Delegación Gustavo A. Madero, a partir de troncos de pinos que fueron podados. Mientras que el olote de maíz se consiguió en un mercado local.

Los soportes fueron esterilizados en autoclave, con el fin de asegurar que los únicos microorganismos presentes en ellos fueran los dos hongos en estudio que se inocularon. Las condiciones de esterilización fueron 121 °C y 15 lb/pg² durante 20 minutos. En la figura 25 se muestran los soportes ya colocados en recipientes de vidrio de forma cuadrangular antes de ser inoculados.



Figura 25. Soportes en recipientes de vidrio rectangular, piña (izquierda) y madera (derecha)

El motivo para el cambio en el soporte de cáscara de piña a olote fue que al momento de hacer la inmovilización, y a pesar de que los soportes estaban estériles, existió una contaminación persistente con un hongo verde olivo, por lo que el crecimiento del *P. chrysosporium* se vio afectado y el desarrollo del *P. cinnabarinus* fue inhibido, como se muestra en la figura 26, dando como resultado la sustitución de las cáscaras de piña, siendo seleccionado el olote.



Figura 26. Soporte inoculado con *P. cinnabarinus*, contaminado: a la izquierda piña y a la derecha madera

Posteriormente los soportes consistentes en olote y madera, igualmente en pedazos de un tamaño aproximado de 1 cm^2 , fueron esterilizados e inoculados en botellas de vidrio, esto para evitar la contaminación al tener un menor contacto con el ambiente (Figura 27).



Figura 27. Soportes en botellas de vidrio, olote (izquierda) y madera (derecha)

Mientras que la inoculación de los soportes con los hongos se realizó en las botellas de vidrio, los tratamientos para la degradación de hidrocarburos se realizaron en los recipientes de vidrio rectangulares.

Las suspensiones de esporas maduras de los hongos, las cuales sirvieron como inóculos, se adicionaron en condiciones de esterilidad, a los soportes en una relación del 20% (100.0 mL de la suspensión de esporas por 500.0 g de soporte) (Figura 28).



Figura 28. Soporte de olote recién inoculado y colocado en horizontal para asegurar mayor contacto del hongo y el inóculo

Se dejaron crecer los hongos en los soportes durante tres semanas y pasado este tiempo los soportes inoculados se agregaron al suelo, en una proporción de 20% de soporte por cada kilogramo de suelo (200 g del soporte por cada Kg de suelo seco) (Figuras 29 y 30). La muestra de suelo no fue esterilizada para la experimentación.



Figura 29. *P. chrysosporium* inmovilizado y colocados en los recipientes rectangulares al momento de iniciar las pruebas de degradación, a la izquierda olote y a la derecha madera



Figura 30. *P. cinnabarinus* inmovilizado y colocados en los recipientes rectangulares al momento de iniciar las pruebas de degradación, a la izquierda olote y a la derecha madera

Pruebas de degradación

En un inicio se tenían dos muestras compuestas a las cuales se les analizó la cantidad de hidrocarburos, encontrando que la correspondiente a la muestra 1 tenía la mayor concentración y por ello se decidió llevar a cabo las pruebas de degradación con el suelo de ésta, que como se mencionó antes, fue la que se tomó en la parte más cercana al centro del sitio contaminado.

Para las pruebas de degradación de los hidrocarburos, se colocaron 1,065 g de suelo de la muestra 1 (considerando que el suelo tiene una humedad del 6% y 1,065 g contendrían 1,000 g de suelo seco) con 100 g de soporte en recipientes de vidrio tapados con aluminio para evitar la contaminación. La incubación fue en cultivo estático a temperatura ambiente. La humedad del sistema se mantuvo desde un principio a un nivel del 60%, agregando cada tercer día 100 mL de agua destilada estéril, que fue en relación con la determinación de la capacidad de retención de agua que tuvo el suelo. Las pruebas tuvieron una duración de seis semanas, la toma de muestras con el fin de evaluar el porcentaje de remoción se tomaron de manera aleatoria (como se describe más adelante) en la semana tres y al finalizar el tratamiento. En la figura 31, se muestran los sistemas utilizados para la degradación de hidrocarburos en suelo.



Figura 31. Sistemas de degradación de hidrocarburos en suelo, *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (izquierda) y en madera (derecha)

Evaluación del porcentaje de remoción

El porcentaje de remoción de los hidrocarburos en las unidades de experimentación se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de análisis de hidrocarburos de esta metodología (extracción y cuantificación).

Se hicieron en total tres determinaciones:

Al inicio de la experimentación para obtener la concentración inicial de hidrocarburos.

En la semana 3, tiempo correspondiente a la mitad del tratamiento

Y en la semana 6, que fue el tiempo final del tratamiento.

En cada sistema se tomaron tres muestras de suelo, las cuales fueron definidas de manera aleatoria seleccionando tres puntos, de los indicados en la figura 32. De cada punto se procuró tomar aproximadamente 4.0 g de suelo.

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12

Figura 32. División en cuadrantes de los sistemas de degradación

En las tablas 13 y 14 se muestran los puntos de muestreo de cada uno de los sistemas, de acuerdo a lo descrito para cada uno de los sistemas de degradación:

Tabla 13. Puntos de muestreo para los sistemas con *P. chrysosporium*

SISTEMA Suelo con <i>P.</i> <i>chrysosporium</i> inmovilizado en olote			SISTEMA Suelo con <i>P.</i> <i>chrysosporium</i> inmovilizado en madera			SISTEMA Suelo con <i>P.</i> <i>chrysosporium</i> sin inmovilizar		
PUNTOS DE MUESTREO			PUNTOS DE MUESTREO			PUNTOS DE MUESTREO		
9	7	5	1	12	6	12	4	7
7	4	5	11	7	8	1	5	9

Tabla 14. Puntos de muestreo para los sistemas con *P. cinnabarinus*

SISTEMA Suelo con <i>P. cinnabarinus</i> inmovilizado en olote			SISTEMA Suelo con <i>P. cinnabarinus</i> inmovilizado en madera			SISTEMA Suelo con <i>P. cinnabarinus</i> sin inmovilizar		
PUNTOS DE MUESTREO			PUNTOS DE MUESTREO			PUNTOS DE MUESTREO		
7	12	3	11	7	2	4	8	10
2	6	5	9	12	3	8	9	1

Los sistemas de experimentación donde se utilizó el hongo *P. chrysosporium* se identificaron con las letras **Ph**, mientras que los sistemas donde se utilizó el hongo *P. cinnabarinus*, se identificaron con las letras **Pc**.

Determinación de las actividades enzimáticas

Los extractos para evaluar la actividad enzimática se prepararon en los siguientes tiempos:

TIEMPO CERO: en los soportes que fueron inoculados con los hongos e incubados durante 3 semanas, al momento de iniciar las pruebas de degradación que fue cuando se agregaron al suelo contaminado.

TIEMPO DOS: en el sistema conformado por el suelo contaminado en presencia de los hongos inmovilizados en los soportes e incubados durante 2 semanas, se hizo extracto tanto del soporte como del suelo.

TIEMPO TRES: en el sistema conformado por el suelo contaminado en presencia de los hongos inmovilizados en los soportes e incubados durante 3 semanas, tiempo que corresponde a la mitad del tratamiento, se hizo extracto tanto del soporte como del suelo.

TIEMPO CUATRO: en el sistema conformado por el suelo contaminado en presencia de los hongos inmovilizados en los soportes e incubados durante 4 semanas, se hizo extracto tanto del soporte como del suelo.

TIEMPO SEIS: en el sistema conformado por el suelo contaminado en presencia de los hongos inmovilizados en los soportes e incubados durante 6 semanas, que corresponde al tiempo total del tratamiento, igualmente se hizo el extracto del soporte y del suelo.

Los extractos enzimáticos se prepararon de la siguiente manera: en recipientes de plástico con tapa se colocaron aproximadamente 5 g de la muestra del hongo desarrollado en el respectivo soporte y se le agregaron 20 mL de una solución buffer de tartrato de sodio 0.25 M a un pH de 3.5 y a una temperatura de 4 °C. Esta mezcla fue agitada manualmente durante 30 minutos y filtrada dos veces, primero con papel filtro y

posteriormente con filtros *Millipore*, usando membranas con un tamaño de poro de 0.45 μ . La actividad enzimática fue determinada inmediatamente después de preparar los extractos (Juárez, 2014).

Para la obtención de las actividades enzimáticas, se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones: una unidad de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de sustrato por minuto, a un pH determinado y a 25 °C, por lo que se encuentra en unidades de μ mol/ml*min. (Kapich *et al.*, 2004). Para poder calcular esta concentración se hace uso de la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon bc \qquad \text{Ecuación 10}$$

Dónde:

A= absorbancia

ϵ = absortividad molar (en unidades de $M^{-1} cm^{-1}$, y el valor depende de cada sustancia y de la longitud de onda a la que se mida)

b= paso de luz (1 cm)

c= concentración

Lacasa

La actividad de la *Lac* fue determinada por el método colorimétrico, utilizando el reactivo 2- 2'azino- bis (3- etilbenzotiazolina- 6 -ácido sulfónico) ABTS (Camarero *et. al.*, 2005). El ABTS fue preparado con el buffer de acetato de sodio 100 mM a un pH de 4.5. La técnica que se siguió fue la siguiente: en un tubo de ensayo se colocaron 500 μ L del extracto enzimático recientemente obtenido y se le agregaron 500 μ L de una solución de ABTS 1.0 mM, midiéndose el incremento de absorbancia a una longitud de onda de 436 nm; una vez iniciada la reacción, se midió la absorbancia cinco veces, el minuto cero y en los minutos uno, tres, cinco y diez. El minuto cero consistió en 500 μ L del extracto enzimático y 500 μ L de buffer de acetato de sodio 100 mM a un pH de 4.5.

Manganeso peroxidasa

La actividad de la enzima *MnP* se determinó por la oxidación del 2,6-dimetoxifenol (DMP) para producir 3,3',5,5'-tetrametoxidifenolquinona; la oxidación es inducida por H_2O_2 (Kapich *et al.*, 2004; Juárez, 2014). La técnica utilizada fue la siguiente: en un tubo de ensayo se colocaron 500 μL de extracto enzimático, 200 μL de DMP 10 mM, 200 μL de una solución de sulfato de manganeso 5 mM y 100 μL de una solución de H_2O_2 4 mM, midiéndose el incremento de absorbancia a una longitud de onda de 470 nm, se midió la absorbancia cinco veces, el minuto cero y en los minutos uno, tres, cinco y diez de la reacción. El minuto cero consistió en 500 μL de extracto, 200 μL de DMP 10 mM, 200 μL de una solución de sulfato de manganeso 5 mM y 100 μL de solución buffer de tartrato de sodio 50 mM a un pH de 4.5. Los reactivos fueron preparados con la solución buffer de tartrato de sodio 50 mM a un pH de 4.5. Para realizar el blanco y las muestras se agregaron los reactivos en el orden descrito anteriormente.

Lignina peroxidasa

El método utilizado para la determinación de la actividad de la *LiP*, está basado en la oxidación del colorante azul de metileno, causada por el peróxido de hidrógeno H_2O_2 (Archibald, 1992). En esta técnica se utilizó un mililitro que contenía 500 μL de extracto enzimático, 300 μL de solución azul de metileno 0.16 mM (esta solución fue preparada con un buffer de tartrato de sodio 0.1 M a un pH de 3.0) y H_2O_2 6.0 mM (igualmente preparado con la solución buffer de tartrato de sodio), midiendo el decremento de la absorbancia a una longitud de onda de 651 nm, la absorbancia fue medida en el minuto cero, uno, tres, cinco y diez de la reacción. El tiempo cero consistió en 500 μL de extracto enzimático, 300 μL de la solución de azul de metileno 0.16 mM y 200 μL de la solución buffer de tartrato de sodio 0.1 M. Tanto los ceros como los reactivos fueron preparados en el orden descrito.

Para obtener la concentración de las actividades enzimáticas se despeja c de la Ecuación. 10:

$$c = \frac{A}{\epsilon b}$$

El valor de la absorptividad molar y la absorbancia medida es diferente en cada una de las enzimas por lo que la absorbancia se dividirá de acuerdo a la enzima tratada y posteriormente el procedimiento es similar.

En el caso de la *Lac* el incremento de la absorbancia se divide entre 29,300 M⁻¹ cm⁻¹ que es el valor de la absorptividad molar del ABTS (ϵ) (Kapich *et al.*, 2004; Moreno y Ospina, 2008); en el caso de la *MnP* el incremento de absorbancia se divide entre 49,600 M⁻¹ cm⁻¹ (valor de la absorptividad molar del DMP) (Kapich *et al.*, 2004) y en el caso de la *LiP* se divide el decremento de la absorbancia (valor absoluto) entre 32,000 M⁻¹ cm⁻¹ (valor de la absorptividad molar del azul de metileno) (Archibald, 1992).

El resto del procedimiento es el mismo en los tres casos y consiste en que b tiene un valor de 1 cm, que al ser sustituido en la ecuación 10 y resuelta da un valor en unidades de M (mol/L). La actividad enzimática es reportada en unidades de $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$, por lo que al valor de mol/L se le aplican 3 factores de conversión, uno para obtener $\mu\text{mol/L}$, otro para $\mu\text{mol/mL}$ y un último que considere que sólo se utilizaron 0.5 mL de extracto. Con los datos anteriores, se construyeron las gráficas de concentración vs tiempo, de donde se obtuvo la actividad enzimática, representada por la pendiente de la curva (Anexo 1).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo

El muestreo fue realizado de acuerdo a la norma NOM-021-RECNAT-2000, tomando tres puntos de muestreo de manera aleatoria y a una profundidad de 30 centímetros (Figura 33).



Figura 33. *Vista del Pozo terra 123*

Como se mencionó en la metodología se consideraron dos zonas en el sitio de muestreo, por lo que se obtuvieron dos muestras compuestas, las cuales fueron analizadas antes de seleccionar una para las pruebas de degradación.

Caracterización del suelo

En la Tabla 15 se presentan los resultados de la caracterización de las dos muestras de suelo, las cuales fueron definidas en la metodología, en la parte del muestreo de este trabajo.

Tabla 15. Valores obtenidos de la caracterización del suelo

Parámetro	Resultado Muestra 1	Resultado Muestra 2	Valores de la NOM-021-RECNAT-2000
pH	7.45±0.0018	7.77±0.01	7.4 - 8.5 medianamente alcalino
Pérdidas al secado	44.25±0.04	42.64±0.22	-----
Humedad	31.93±1.92	30.68±0.69	-----
Nitrógeno total (mg/kg)	0.11	0.10	0.10 – 0.15 medio
Nitrógeno inorgánico (mg/kg)	12.76±2.7	11.42±2.7	10 – 20 bajo
Materia orgánica (%)	15.05±0.34	14.47±0.29	11.0 – 16.0 alto
Capacidad de retención del agua (mL/g)	0.97±0.18	0.95±0.02	----
Fósforo (mg/kg)	1.94±0.003	1.93±0.001	< 5.5 bajo

De acuerdo a la norma NOM-021-RECNAT-2000 y con base a los resultados de la tabla 15 el suelo, en ambas muestras, puede ser clasificado como medianamente alcalino, con un contenido de nitrógeno total medio, con un bajo contenido de nitrógeno inorgánico, un alto contenido de materia orgánica y un contenido de fósforo bajo.

Si bien en la norma NOM-021-RECNAT-2000 el método AS-05 es descrito para la humedad, aquí se consideraron las pérdidas al secado, debido a que las muestras de suelo contaminado contienen un gran número de compuestos orgánicos volátiles (COV's) que a 100 °C se pueden volatilizar. Por lo que al realizar las dos determinaciones, se puede conocer tanto la humedad como la cantidad aproximada de los COV's presentes en el suelo.

El parámetro del nitrógeno inorgánico, se refiere a la cantidad que puede ser aprovechada por los microorganismos, por lo que al ser su valor bajo en el suelo, se recomienda utilizar otra fuente de nutrientes. En este estudio, lo adecuado es utilizar un soporte para los hongos, rico en nitrógeno para suplir su deficiencia en el suelo (NOM-021-RECNAT-2000).

Por otro lado, se tiene que tanto la capacidad de retención como la humedad del suelo, son parámetros que indican que el nivel de agua en el sistema sea el adecuado para una correcta actividad microbiana durante las pruebas de degradación. La capacidad de retención sirve para calcular la cantidad de agua que se necesita para tener un 60% de humedad en el sistema.

Inmovilización de las cepas

Una vez realizada la inoculación de los hongos en los soportes, el crecimiento fue monitoreado cada semana hasta cumplir con las tres semanas de incubación, tiempo en el cual el desarrollo del micelio alcanzó una invasión completa de los soportes, aunque este desarrollo fue paulatino, ya que en la semana dos se observó desarrollo en toda la superficie, pero no en la parte interna de los soportes y en la semana tres el desarrollo se observó en casi toda la superficie de los soportes. En las figuras 34 y 35, se observa el desarrollo de *P. chrysosporium* sobre olote y sobre madera, respectivamente.



Figura 34. Crecimiento de *P. chrysosporium* sobre el olote



Figura 35. Crecimiento de *P. chrysosporium* sobre la madera

El sistema de suelo con *P. chrysosporium* no inmovilizado fue evolucionando como se muestra en la figura 36, durante las tres semanas de incubación, mismo tiempo de incubación que los otros sistemas que fueron inoculados con hongos.



Figura 36. Evolución del suelo inoculado con *P. chrysosporium* no inmovilizado

El crecimiento del *P. cinnabarinnus* sobre los soportes fue seguido durante tres semanas (Figuras 37 y 38), en la tercer semana se observó una invasión total de los soportes, fue en este momento que se realizó la inoculación del suelo con el hongo inmovilizado en el soporte.



Figura 37. Crecimiento de *P. cinnabarinus* sobre el olote



Figura 38. Crecimiento de *P. cinnabarinus* sobre la madera

Los experimentos con el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera y ahora en olote de maíz, se realizaron nuevamente al mismo tiempo pero esta vez en botellas con tapón para evitar una futura contaminación. La proliferación del hongo sobre los soportes se presentó esta vez a las dos semanas de incubación, pero para evitar cambios en las condiciones se dejó crecer hasta la tercera semana. En la figura 39, se pueden observar los soportes de olote y madera inoculados con el hongo *P. chrysosporium* ya en la tercer semana.



Figura 39. Soporte inoculado con *P. chrysosporium* a la izquierda olote y a la derecha madera

Análisis de hidrocarburos, extracción y cuantificación

Los contenidos de hidrocarburos fueron determinados de la fracción media y la fracción pesada, esto debido a que se trata de una mezcla y conforme a la norma NOM-SEMARNAT/SS-2003 se utilizaron los solventes adecuados para cada uno (triclorometano para la fracción media y hexano para la pesada). Los resultados de las muestras uno y dos se presentan en las tablas 16 y 17 respectivamente.

Tabla 16. *Contenido de hidrocarburos en la muestra uno*

Fracción	Concentración (ppm)
Media	27,838 ± 425
Pesada	29,810 ± 318

Tabla 17. *Contenido de hidrocarburos en la muestra dos*

Fracción	Concentración (ppm)
Media	17,312 ± 419
Pesada	18,473 ± 371

Los hidrocarburos analizados fueron los de fracción pesada y los correspondientes a la muestra más contaminada. Se tomó en cuenta la NOM-138-SEMARNAT-SSA1-2012 para hacer el análisis y su cuantificación. En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos durante (semana 3) y al finalizar el tratamiento (semana 6). Hidrocarburos iniciales: 29,810± 318 mg/kg de suelo en base seca.

Tabla 18. Contenido de hidrocarburos totales fracción pesada en los diferentes sistemas durante las pruebas de degradación

Tratamientos	Tiempo (semanas)	HTP's residuales (mg/kg)	HTP's degradados (%)
1 Ph	3	11,594 ± 514	61.12
	6	9,463 ± 265	68.27
2 Ph	3	9,220 ± 197	69.1
	6	8,135 ± 269	72.72
T Ph	3	29,088 ± 386	2.45
	6	29,040 ± 201	2.61
Ta	3	29,112 ± 194	3.91
	6	28,654 ± 484	3.91
1 Pc	3	13,953 ± 247	53.21
	6	11,072 ± 105	62.87
2 Pc	3	13,538 ± 553	54.6
	6	11,274 ± 227	62.19
T Pc	3	28,783 ± 746	3.47
	6	28,467 ± 438	4.53
Tb	3	29,182 ± 230	2.14
	6	28,683 ± 638	3.81

En la figura 40 se presenta la gráfica que muestran los hidrocarburos remanentes para cada tratamiento. Se nota que los testigos no tuvieron remoción significativa y que el tratamiento con mayor remoción (pues pasó de 29,810 ± 318 a 8,135 ± 269) fue el que consistió en *P. chrysosporium* inmovilizado en olote, el cual tuvo un desarrollo que le permitió crecer en el suelo (Figura 41).

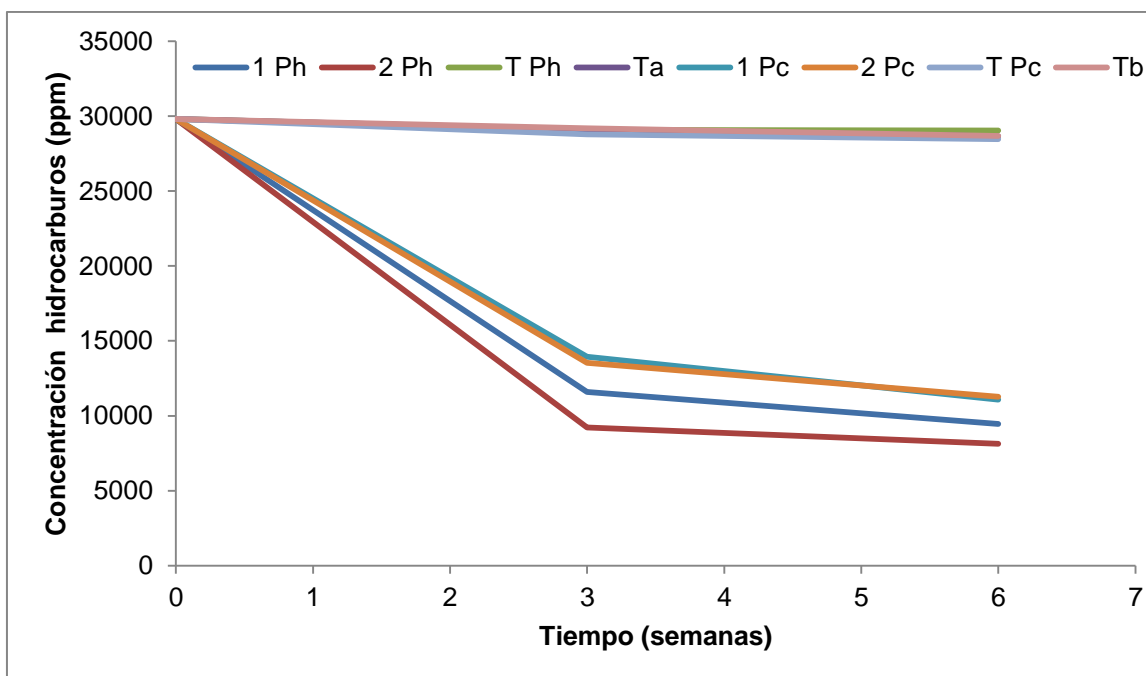


Figura 40. Gráfica que muestra el contenido de hidrocarburos al finalizar las pruebas de degradación.



Figura 41. *P. chrysosporium* inmovilizado en olote, las flechas destacan la invasión del suelo y a la derecha se observan las paredes y la invasión del hongo en el suelo

En la figura 42 se presenta la gráfica que muestra la remoción de los hidrocarburos en forma de porcentaje, notándose que el sistema correspondiente a *P. chrysosporium* inmovilizado en olote fue el que removió una mayor cantidad de hidrocarburos, alcanzando un 72%.

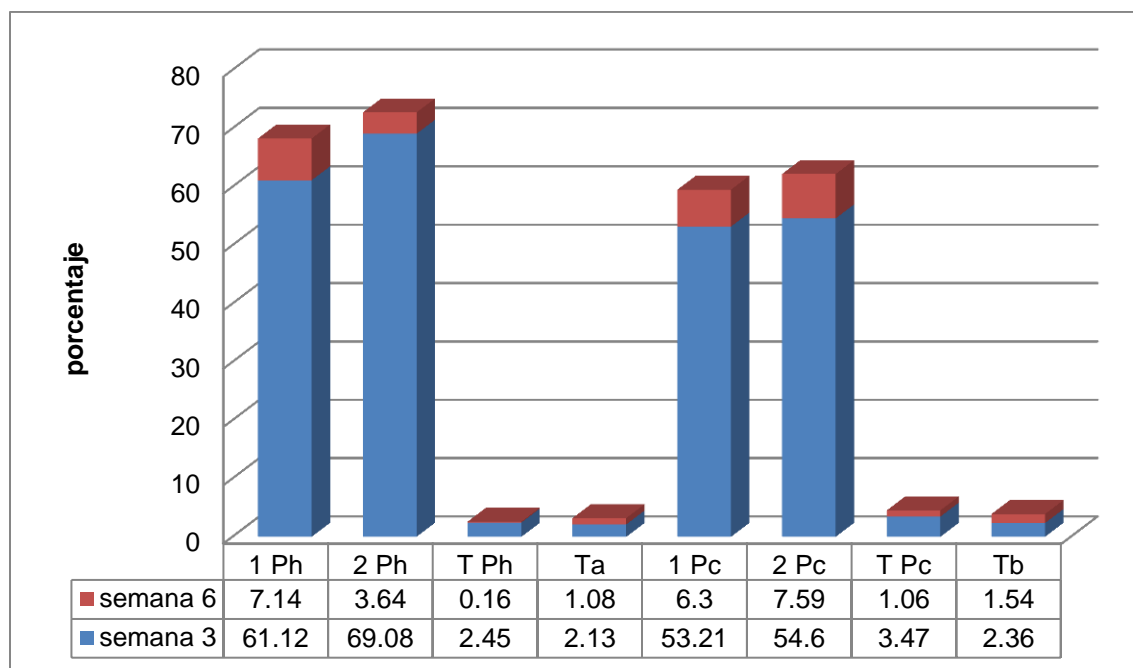


Figura 42. Gráfica que muestra el porcentaje de remoción de hidrocarburos en los tratamientos

Cabe destacar que la mayor remoción de hidrocarburos en todos los tratamientos ocurrió en las primeras tres semanas, alcanzando un máximo de 69% de con el tratamiento del hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote y en las siguientes tres semanas la remoción fue menor, ya que solo alcanzó un 3.6% más en el caso del *P. chrysosporium* igualmente inmovilizado en olote. También se aprecia que los tratamientos que utilizaron *P. chrysosporium* inmovilizado (principalmente olote) fueron los más efectivos en comparación con los tratamientos con *P. cinnabarinus* inmovilizado, teniendo una remoción hasta 15% mayor en la semana tres, comparando los tratamientos del *P. cinnabarinus* y el *P. chrysosporium* inmovilizados en olote.

La cantidad de biomasa observada tuvo varios cambios, observándose que en las semanas de la uno a la tres había invadido el suelo, y posteriormente se había inhibido un poco, aun conservando la humedad. Esto explica por qué en las primeras tres semanas la cantidad de hidrocarburos degradados fue la máxima y posteriormente fue disminuyendo.

Actividades enzimáticas

Las actividades que se determinaron fueron las de las enzimas *Lac*, *MnP* y *LiP*, las cuales son extracelulares no específicas, por lo que actúan sobre los hidrocarburos por tener éstos una estructura química similar a la de la lignina. La actividad fue medida durante las pruebas de degradación únicamente.

Actividad enzimática de Lacasa

La actividad de esta enzima fue medida a lo largo de las pruebas de degradación, es decir, con los hongos inmovilizados en los respectivos soportes, ya incorporados al suelo. En la tabla 19 se muestran los valores de cada sistema y en la figura 46 se muestra la gráfica donde se aprecia el incremento de la actividad a lo largo del tiempo.

Tabla 19. Actividad de la Lac en los diferentes tratamientos

Tratamiento	Tiempo (semanas)	Actividad enzimática ($\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$)
1 Ph	0	no detectada
	2	no detectada
	3	no detectada
	4	no detectada
	6	no detectada
2 Ph	0	no detectada
	2	no detectada
	3	no detectada
	4	no detectada
	6	no detectada
1 Pc	0	0.0101 ± 0.0004
	2	0.0131 ± 0.0006
	3	0.0174 ± 0.0011
	4	0.0093 ± 0.0005
	6	0.0078 ± 0.0002
2 Pc	0	0.0204 ± 0.0003
	2	0.0161 ± 0.001
	3	0.0114 ± 0.0001
	4	0.0091 ± 0.0002
	6	0.0076 ± 0.0006

1 **Ph** = Suelo + *P.chrysosporium* inmovilizado en madera; 2 **Ph** = Suelo + *P.chrysosporium* olote.

1 **Pc** = Suelo + *P.cinnabarinus* inmovilizado en madera; 2 **Pc** = Suelo + *P.cinnabarinus* olote.

La explicación de porqué no fue detectada la Lac para el *P. chrysosporium* es que esta enzima no fue sintetizada por dicho hongo, por lo que al determinar su actividad, la absorbancia simplemente no mostró ningún cambio, esto es que el blanco y la prueba tenían la misma absorbancia.

En la figura 43 se observa el cambio que tuvo la enzima en cada tratamiento

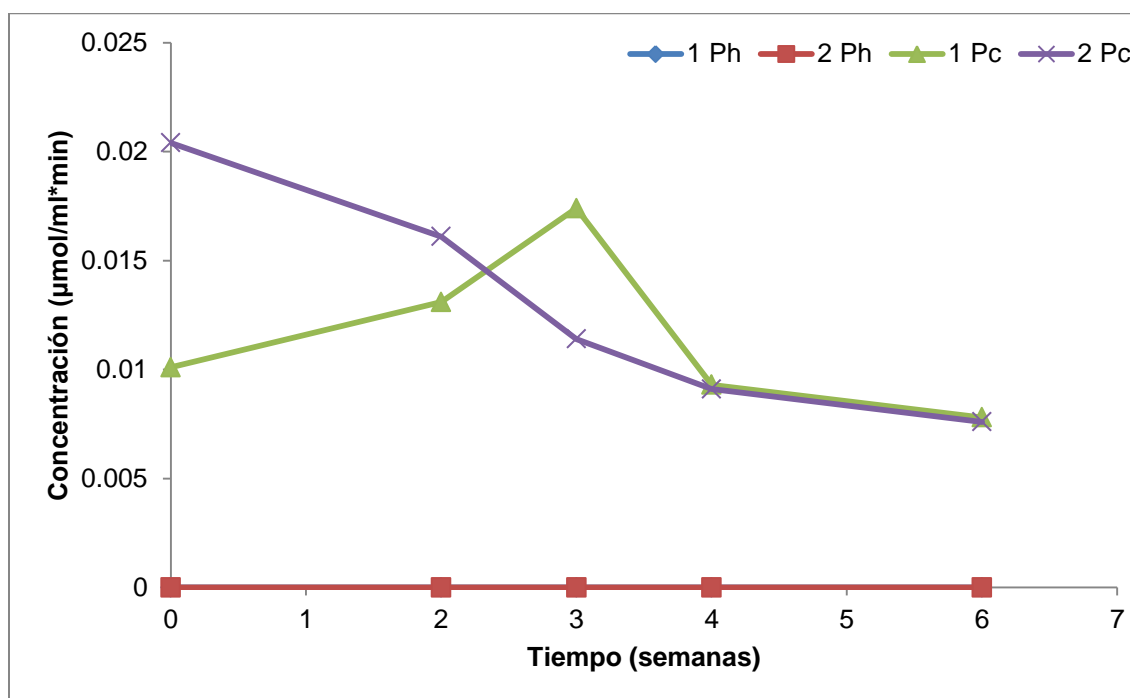


Figura 43. Gráfica que muestra el comportamiento de la Lac a través del tiempo en cada tratamiento

Se puede observar en la figura 43, que el soporte del olote, al contar con gran cantidad de carbohidratos simples (Córdoba *et al*, 2013), se convirtió en el soporte “preferido” del hongo, produciendo una cantidad de biomasa tal que podía observarse en las paredes del recipiente y por lo tanto, una actividad enzimática mayor en comparación con el soporte de la madera, en el momento en que se puso en contacto el hongo con el suelo, por lo que en la semana tres se produjo el decremento de la cantidad de hidrocarburos en las muestras con este hongo (degradando un 53.6% del hidrocarburo total). Con respecto a la madera, el hongo tuvo un crecimiento menor, comparado con el olote, lo cual afectó a la actividad de la enzima, que si bien ésta aumentó a lo largo del tiempo, se obtuvo una degradación menor (51%). El crecimiento del *P. cinnabarinus* en suelo fue visible las primeras tres semanas; posterior a este tiempo el hongo dejó de crecer.

Actividad enzimática de Manganeso Peroxidasa

La actividad de la *Manganeso Peroxidasa (MnP)* fue medida considerando como tiempo cero el momento en que se dio inicio a las pruebas de degradación y fue medido cinco veces por cada hongo y cada soporte. En la tabla 20 se pueden apreciar los valores de la actividad enzimática de la *MnP* en los diferentes tratamientos a través del tiempo.

Tabla 20. Actividad de la *MnP* en los diferentes tratamientos

Tratamiento	Tiempo (semanas)	Actividad enzimática ($\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$)
1 Ph	0	0.0043 ± 0.0014
	2	0.0061 ± 0.001
	3	0.0079 ± 0.001
	4	0.0048 ± 0.0002
	6	0.0039 ± 0.0001
2 Ph	0	0.0028 ± 0.0004
	2	0.0071 ± 0.0004
	3	0.0094 ± 0.0001
	4	0.0069 ± 0.0002
	6	0.0055 ± 0.0003
1 Pc	0	0.0046 ± 0.0005
	2	0.0053 ± 0.0003
	3	0.0072 ± 0.0004
	4	0.0046 ± 0.0001
	6	0.0038 ± 0.0002
2 Pc	0	0.0025 ± 0.0005
	2	0.0063 ± 0.0002
	3	0.0094 ± 0.0004
	4	0.0051 ± 0.0002
	6	0.0042 ± 0.0003

1 **Ph** = Suelo + *P.chrysosporium* inmovilizado en madera; 2 **Ph** = Suelo + *P.chrysosporium* olote d.

1 **Pc** = Suelo + *P.cinnabarinus* inmovilizado en madera; 2 **Pc** = Suelo + *P.cinnabarinus* olote.

En los resultados anteriores se observa la presencia de la *MnP* en ambos hongos. En los tratamientos 1 **Ph** y 2 **Ph** (inmovilización de *P. chrysosporium* en madera y olote, respectivamente) hubo indicios de crecimiento en los soportes y el suelo durante todo el tratamiento, es por ello que la actividad enzimática fue encontrada durante todo el tratamiento, ya que incluso se apreciaba el crecimiento de la biomasa en la matriz del suelo.

En la figura 47 se puede apreciar la actividad de la enzima *MnP* a través del tiempo en cada tratamiento.

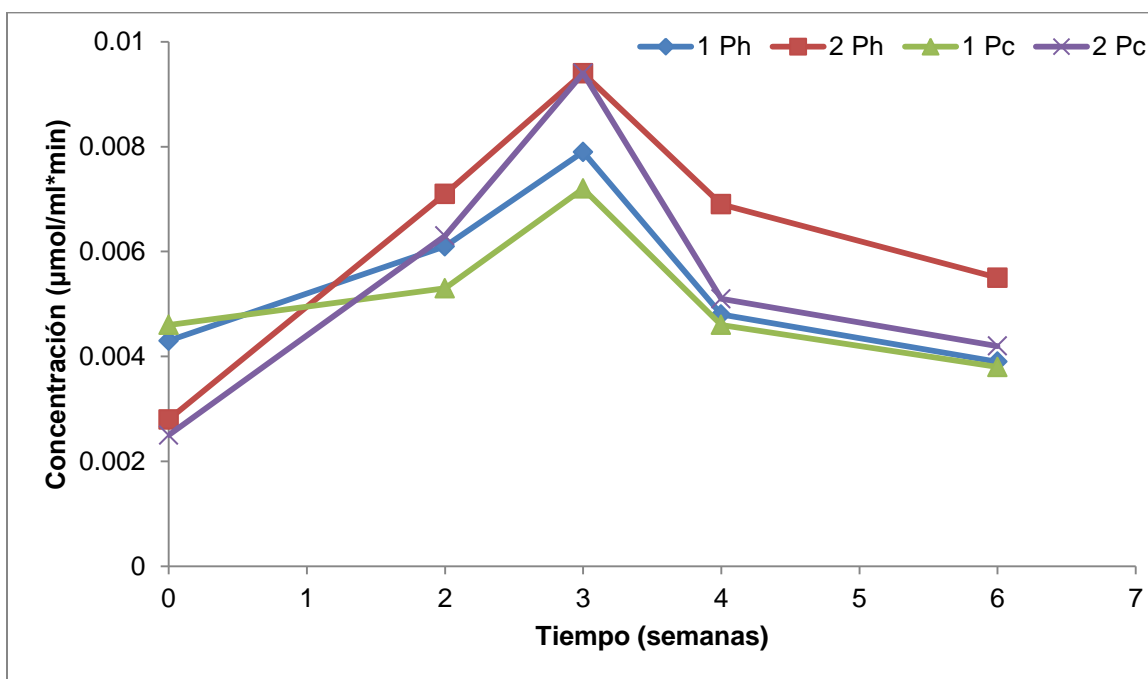


Figura 47. Gráfica que muestra el comportamiento de la MnP a través del tiempo en cada tratamiento

P. chrysosporium inmovilizado en olote y madera fueron los sistemas en los cuales se observó mayor degradación y que tuvieron una actividad enzimática mayor que cualquier otro sistema, indicando que muy probablemente la *MnP* es una de las enzimas extracelulares más eficientes y con mayor actividad en este hongo.

El desarrollo de *P. cinnabarinus* fue menor que el de *P. chrysosporium*; el *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote tuvo un mejor desarrollo que en madera. A pesar de que los desarrollos entre los diferentes hongos fueron visiblemente diferentes, la actividad enzimática de la *MnP* no tuvo un valor medido tan diferente entre sí.

Actividad enzimática de Lignina peroxidasa

La actividad de la *LiP* ha sido reportada en ambos hongos (Lucas, 2001), siendo más frecuentemente asociada al *P. cinnabarinus*, y considerándose igualmente como enzima extracelular y no específica. En la tabla 21 se observan los datos de la actividad de la *LiP* a través del tiempo, durante las pruebas de degradación.

Tabla 21. Actividad de la Lignina peroxidasa en los diferentes tratamientos

Tratamiento	Tiempo (semanas)	Actividad enzimática ($\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$)
1 Ph	0	0.0007
	2	0.0008
	3	0.0011
	4	0.0006
	6	0.0005
2 Ph	0	0.0006
	2	0.0007
	3	0.0009
	4	0.0006
	6	0.0005
1 Pc	0	0.0012
	2	0.0014
	3	0.0015
	4	0.0008
	6	0.0007
2 Pc	0	0.0008
	2	0.0011
	3	0.0014
	4	0.0010
	6	0.0009

1 **Ph** = Suelo + *P.chrysosporium* inmovilizado en madera; 2 **Ph** = Suelo + *P.chrysosporium* olote.

1 **Pc** = Suelo + *P.cinnabarinus* inmovilizado en madera; 2 **Pc** = Suelo + *P.cinnabarinus* olote.

Como se puede observar en la tabla anterior, la enzima lignina peroxidasa presentó mayor actividad en el hongo *P. cinnabarinus*, lo cual se verifica en la figura 48 donde se observa la actividad de la enzima a través del tiempo. En la semana tres de las pruebas de degradación existe un incremento en la actividad y ésta se encuentra en el punto más alto, momento en el cual la concentración de hidrocarburos tuvo un mayor decremento.

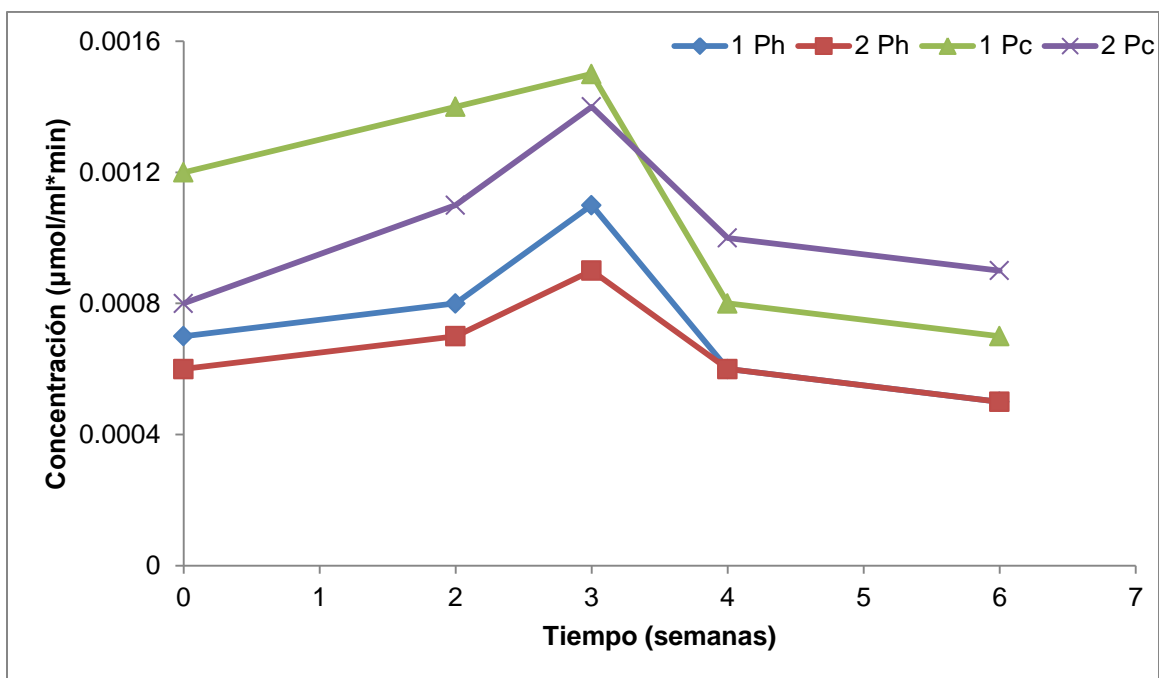


Figura 48. Gráfica que muestra el comportamiento de la LiP a través del tiempo en cada tratamiento

En cuanto a la actividad de esta enzima ésta fue mayor cuando se utilizó madera como soporte, a pesar de que el crecimiento de la biomasa no fue el mayor. En este caso fue la enzima *LiP* la que se encontró en mayor cantidad en el hongo *P. cinnabarinus*.

En la tabla 22 se observa una relación concluyente de los sistemas con el porcentaje de degradación reportado, medida con los hidrocarburos remanentes, y con la cantidad de actividad enzimática en los mismos momentos (semana tres de las pruebas y la mitad del tratamiento) y en la semana seis, correspondiente al final de las pruebas.

Tabla 22. Relación entre los sistemas y las diferentes actividades enzimáticas

SISTEMA	Tiempo de incubación (semanas)	Concentración inicial de HC'S (ppm)	Concentración final de HC'S (ppm)	% de remoción	Actividad Lacasa ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$)	Actividad MnP ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$)	Actividad LiP ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$)
1 Ph	3	29,810	11,594	61.1	ND	0.0079	0.0011
	6	29,810	9,463	68.2	ND	0.0039	0.0005
2 Ph	3	29,810	9,220	69.1	ND	0.0094	0.0009
	6	29,810	8,135	72.7	ND	0.0055	0.0006
1 Pc	3	29,810	13,953	53.2	0.0131	0.0072	0.0015
	6	29,810	11,072	59.5	0.0093	0.0038	0.0007
2 Pc	3	29,810	13,538	54.6	0.0114	0.0094	0.0014
	6	29,810	11,274	62.2	0.0076	0.0042	0.0009

En la tabla anterior solo se muestran resultados de los tratamientos con los hongos inmovilizados, ya que los otros tratamientos no contaban con actividad enzimática que pudiera reportarse.

Se puede apreciar que en la tercera semana de las pruebas de degradación fue cuando hubo mayor actividad enzimática en todos los tratamientos, es el mismo momento en el cual hay un máximo en la biomasa y en la degradación de hidrocarburos (todos los tratamientos degradan más del 50% en ese tiempo). El hongo *P. chrysosporium* fue el que presentó un mayor porcentaje de degradación, esto también es debido al desarrollo del hongo en el suelo pues el micelio del hongo había penetrado la matriz de suelo hasta la semana 5, lo que le permitía estar más en contacto con el contaminante, mientras que en el *P. cinnabarinus* solo desarrolló su micelio en el suelo durante las primeras tres semanas.

Cuiping *et al.* (2009) y Wang *et al.* (2013) verificaron la degradación de hidrocarburos utilizando el *P. chrysosporium*, sin inmovilizar e inmovilizado, obteniendo en ambos casos casi un 50% de degradación en tiempos entre 40 y 50 días, mientras en este proyecto el sistema del hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2 **Ph**) que fue trabajado durante 42 días, tuvo una degradación del 72.7% haciéndolo que sea altamente efectivo, esto podría indicar que el hecho de tener un soporte de fácil degradación incrementa la

capacidad degradativa del hongo. La actividad medida de la enzima *MnP* fue mayor a la de la *LiP*, por lo que se puede relacionar el alto porcentaje de degradación de hidrocarburos en ese sistema a la semana seis con la enzima *MnP*, considerándose como la más importante en la degradación de hidrocarburos.

Zhang *et al.* (2015) utilizó el *P. sanguineus* para degradar hidrocarburos durante 30 días, encontrando una degradación de entre 40 y 50% mientras que en este proyecto el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote de maíz (sistema 2 **Pc**) obtuvo un porcentaje de degradación de hidrocarburos del 62.2%, lo cual lo hace un tratamiento más efectivo. En orden descendiente, los valores de las actividades enzimáticas obtenidas en este sistema en la semana tres fue *Lac*>*MnP*>*LiP*. Lo cual indicaría que la enzima que influye en mayor proporción a la degradación es la *Lac*.

La diferencia observada en los resultados, en cuanto al desarrollo de los hongos en ambos soportes, se puede deber a 2 factores: (1) Al tipo y contenido de sustratos, ya que el olote de maíz es muy rico en azúcares, mientras que la madera es rica en celulosa y lignina (Córdoba *et al.*, 2013), y (2) Al tipo de superficie de cada uno, el olote de maíz es poroso y suave, mientras que la madera es lisa y dura.

8

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al comparar los resultados de los sistemas testigo sin inmovilizar con sus respectivos sistemas inmovilizados (T **Ph** con 1 **Ph** y 2 **Ph**) (T **Pc** con 1 **Pc** y 2 **Pc**) se puede verificar que la inmovilización de los hongos permitió un mejor desarrollo y una degradación mayor, ya que los hongos sin inmovilizar tuvieron una degradación máxima del 5% del hidrocarburo inicial mientras que los sistemas inmovilizados tuvieron degradación entre el 62 y 72%.

La selección de los soportes para los hongos se realizó, por un lado desde un punto de vista de la Sustentabilidad Ambiental, ya que siendo residuos, se está proponiendo su aprovechamiento en un proceso biotecnológico para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Y por otro lado, el contenido de nutrientes que aportan dichos residuos para el desarrollo de los hongos, permite que haya el sustrato de apoyo para la producción adecuada de las enzimas extracelulares, proceso que recibe el nombre de Co-Metabolismo.

La degradación de los hidrocarburos se pudo relacionar a la presencia de la actividad enzimática pues en el sistema del hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2 **Ph**), que fue el que presentó la mayor actividad de la enzima MnP contaba con una mayor degradación de los hidrocarburos presentes en el sistema por lo que se puede concluir que esta enzima es la principal encargada de la degradación de contaminantes. Al mismo tiempo el sistema del hongo *P. cinnabarinnus* inmovilizado en olote (2 **Pc**) mostró una mayor actividad de la enzima *Lac*, seguida por la *MnP* y por último la *LiP*, concluyéndose que en este caso la enzima principal para la degradación es la *Lac*.

Para acelerar el desarrollo de los hongos inmovilizados, tanto sobre la madera como sobre el olote, se recomienda hacer una segunda inoculación en la semana tres o cuatro obteniendo un mejor desarrollo del hongo y una mayor degradación.

La inmovilización en madera podría hacerse en un menor tiempo si al momento de inocular se le añadiera solución de glucosa, permitiendo que los soportes se mojen de la solución y así los hongos puedan desarrollarse más fácilmente en la superficie lisa de la madera.

Los hongos inmovilizados en olote de maíz tuvieron mayor actividad enzimática y mayor degradación que los inmovilizados en madera, lo cual indicaría que estos soportes indujeron la producción enzimática y ésta, a su vez provocó una mayor degradación, por lo que la presencia de la enzima es la responsable de la degradación de los hidrocarburos, lo cual indica que se cumplió la hipótesis planteada en este proyecto.

Una última recomendación sería la de verificar el uso de otros posibles soportes ricos en lignina, celulosa y/o glucosa, tales como bagazo de caña, residuos de poda o algún otro tipo de madera.

REFERENCIAS

- Agarry, S. E., Owabor, C. N., Yusuf, R.O. (2010). Studies on Biodegradation of Kerosene in Soil under Different Bioremediation Strategies. *Bioremediation Journal*. **14**: 135–141.
- Avelar, J. E. (2013). Aplicación de la química verde en la determinación de hidrocarburos en suelo. Proyecto Terminal de Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.
- Archivald, F.S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 31130-31136
- ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (2016). Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html
- Baird, C., Cann, M. Química Ambiental, Editorial Reverté (2014). 2ª edición. Páginas: 236-240; 664-672.
- Baldrian, P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal ecology*. **1**: 4-12.
- Benavides, L. J., Quintero, G., Guevara, V. A. L., Jaimes, C. D. C., Gutiérrez, R. S. M., Miranda, G. J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova Publicación Científica*. **4**: 1-16.
- Brown, W. y Poon, T. (2012). Introduction to Organic Chemistry. 3th Edición. Pp 244-245.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., Martínez, A. T. (2005) Lignin-Derived compounds ass efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 1775-1784.
- Castañeda, B.M.T. (2004). Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Azcapotzalco.
- Córdoba, J.A.; Salcedo, E.; Rodríguez, R.; Zamora, J. F.; Manríquez, R.; Contreras, H.; Robledo, J.; Delgado, E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Revista latinoamericana de química*, **41**: 171-184

Cruz, C.M.R. (2003). Biodegradación de DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano), en suelos agrícolas por el hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium*. Tesis de Maestría en Ciencias e Ingeniería Ambientales. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.

Cuiping, W., Hongwen, S., Jieming, L., Yimeng, L., Qingmin, Z. (2009). Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere*. **77**: 733–738.

CONAFOR, Comisión Nacional Forestal. (2015) Informe Final Cuenca Forestal Industrial del Golfo de México. Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/80878/Informe_Final_Cuenca_Forestal_Industrial_del_Golfo_de_Mexico__parte_1_fase_1_2_.pdf

Díaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*. **7**: 173–180.

Ding, J., Cong, J., Zhou, J., Gao, S. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*. **20**: 88–93.

Fernández, L. L., Rojas, A. N., Roldán C. T., Ramírez, I. M., Zegarra M. H., Hernández R. R., Reyes A. J., Flores, H. D., Arce, O. J. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados.

Gomes, E., Aguilar, A. P., Carvalho, C. C., Bonfa, M. R. B., Dasilva, R., Boscolo, M. (2009). Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*. **40**: 31-39.

González, N. “Ordeñan” a Pemex 50 mdp al día por robo de combustibles. Revisado 22-09-2015 <http://www.dineroenimagen.com/2015-09-21/61826>.

Haritash, A. K., Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. **169**: 1-15.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) (2016). Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos 2016. Síntesis de Información Geográfica del Estado de Tabasco. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

Instituto de Ciencias Agrarias – CSIC. Propiedades físicas del suelo: la capacidad de retención de agua. Disponible en: http://www.ciudadciencia.es/doc/files/agricultura%20sostenible%20en%20el%20aula/FICHA_A_PROPIEDADES_CC.pdf revisado en Octubre 2015

Ikehata, K., Buchanan, I. D., Pickard, M. A., Smith, D.W. (2004). Optimization of extracellular fungal peroxidase production by 2 *Coprinus* species. *Canadian Journal of Microbiology*. **50**: 1033-1040

Instituto de Ciencias Agrarias de España www.ciudadciencia.es/doc/files/agricultura%20sostenible%20en%20el%20aula/FICHA_PROPIEDADES_CC.pdf revisado en Enero 2016

Jagjit, S.Y., Khajamohiddin, S. (2012). P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Critical Reviews in Microbiology*. **38**: 339-363.

Juárez, D.O.G. (2014). Estudio del efecto del pH en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Proyecto Terminal de Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.

Kapich, A., Prior, B., Botha, A., Galkin, S., Lundell, T., Hatakka, A. (2004). Effect of lignocellulose containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial Technology*. **34**: 187-195.

Lau, E., Gan, S., Ng, H. (2010). Extraction Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils International. Review Article. *Journal of Analytical Chemistry*. **2010**: 9 pages, Article ID 398381

Liang, H., Gao, D., Zeng, Y. (2012). Ligninolytic enzyme production by *phanerochaete chrysosporium* immobilized on different carriers. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **35**: 1179-1184.

Lucas, L. R. (2001). Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaen. 148 páginas

Martínez, V.J.G., Hernández, R.M.A., Ojeda, M.M.E., García, M.M.J. (2011). Condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para el desarrollo *in vitro* del microorganismo hidrocarbonoclasta *Penicillium* sp. *Akadémeia*. **9**: 97-112.

Ming, C. C., Hung, Y. S., Wen, P. H., Min, C. W. (2005). Using Nanoscale Zero-Valent Iron for the Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Soil ISSN 1047-3289. *Journal Air and Waste Management*. **55**: 1200–1207.

Moreno, S. N., Ospina V. X. A. (2008) Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique. Trabajo de grado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias

Mougin, C., Jolival, C., Malosse, C., Chaplain, V., Sigoillot, J.C., Asther, M. (2002) Interference of Soil Contaminants with Laccase Activity During the Transformation of Complex Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Liquid Media. *Polycyclic Aromatic Compounds*. **22**: 673-688.

Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. México. Diario Oficial de la Federación.

Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. México. Diario Oficial de la Federación.

Olguín, E. J., Hernández, M. E., Sánchez, G. G. (2007). Hydrocarbon mangroves pollution and bioremediation, phytoremediation and restoration strategies. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. **23**: 139-154.

Pecingina, D., Cirtîna, D. (2013). Bioremediation technology for decontamination of soils polluted with petroleum hydrocarbons. *Fiability and Durability Supplement Editura "Academica Brâncuși"*. **2013-1**: 342-345.

PEMEX. Anuario Estadístico (2013).

Pons, J.A., Guerrero, P.J., Zavala, C., Alarcón, A. (2011). Removal of oil and petroleum compounds from soils with different physical and chemical characteristics. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. **27**: 1-15.

Popa, R., Calinoiu, M. (2012). Technologies for bioremediation of soils contaminated with petroleum products. *Fiability and Durability Supplement Editura "Academica Brâncuși"*. **2012-1**: 291-296.

Qian, L., Chen, B. (2012). Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*. **24**: 1639–1646.

Quintero, D. J. C. (2011). Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*. **64**: 5867-5882.

Rodríguez, R., F. (2006) Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavidio-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales. Tesis Doctoral. Unidad de Granada, Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología.

Romaniuk, R., Brandt, J. F., Rios, P. R., Giuffra, L. (2007). Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ciencia del Suelo*. **25**: 139-149.

Saichek, E., Reddy, K. (2005). Surfactant-enhanced electrokinetic remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heterogeneous subsurface environments. *Journal of Environmental Engineering and Science*. **4**: 327–339.

Schliephake, K, Lonergan, G.T., Jones, C., Mainwaring, D.E. (1993). Decolourisation of a pigment plant effluent by *Pycnoporus cinnabarinus* in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. **15**: 1185-1188.

SEMARNAT (2003). Capítulo 3 Suelos de México. Revisado 15-11-2015 http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/informacionambiental/Documents/pdf/cap_3_suelos.pdf

SEMARNAT (2013). Espacio digital geográfico (ESDIG). Disponible en:

<http://www.semarnat.gob.mx/temas/estadisticas-ambientales/espacio-digital-geografico-esdig>

Shah, V., Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Can. J. Microbiol*. **48**: 857-870.

Tekere, M., Read, J.S., Mattiasson B. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. **115**: 367–377.

Teutli, L. M. M. M., Ruíz, T. A. C., Rodríguez, Z. K. G. I., Gonzáles, A. M. P., Oropeza, G. M. T., Gonzales, M. I. (2003). Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos y

de lodos de recorte mediante electrólisis, compuestos oxidantes y zeolitas naturales. *Tecnología Ciencia Educación*. **2**: 81-89.

Usman, M., Faure, P., Hanna, K., Abdelmoula, M., Ruby, C. (2012). Application of magnetite catalyzed chemical oxidation (fenton-like and persulfate) for the remediation of oil hydrocarbon contamination. *Fuel*. **96**: 270-276.

Villegas, A. Derrame deja sin agua a 500 mil en Tabasco. Periódico Milenio. Revisado 15 de Abril de 2015.

http://www.milenio.com/estados/Derrame_de_crudo_deja_sin_agua_a_Tabasco-derrame_de_hidrocarburo-potabilizadoras_0_500349999.html

Wang, C., Yu, L., Zhang, Z., Wang, B., Sun, H. (2013). Tourmaline combined with *Phanerochaete chrysosporium* to remediate agricultural soil contaminated with PAHs and OCPs. *Journal of Hazardous Materials*. **264**: 439– 448.

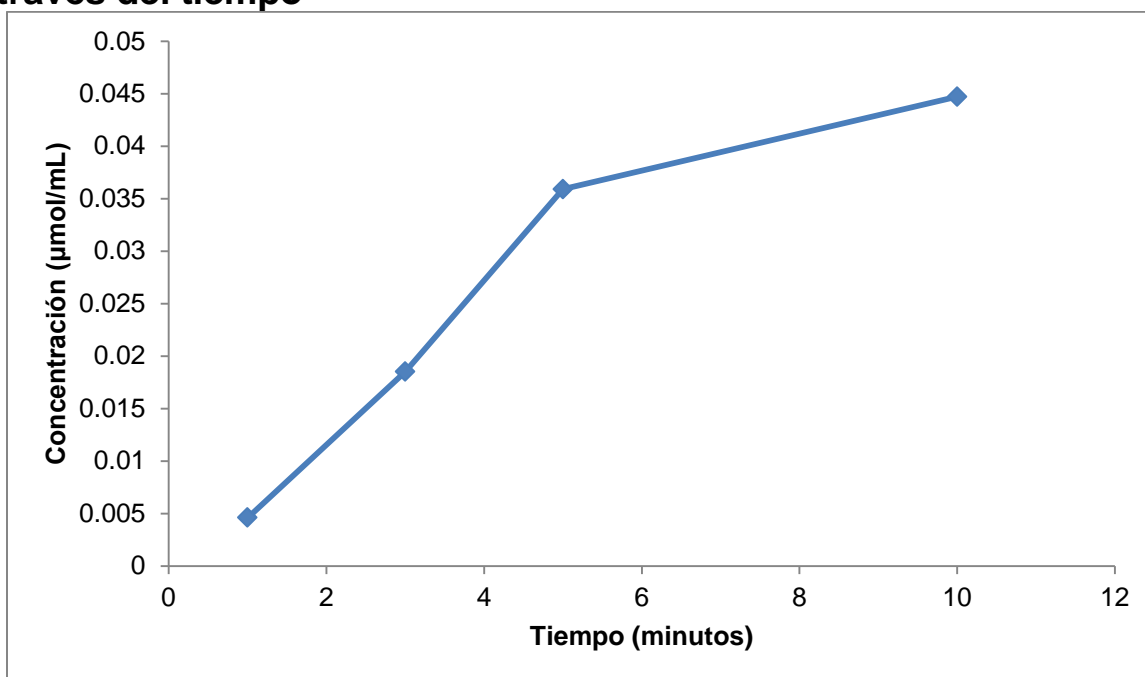
Wang, C., Sun, H., Liu, H., Wang B. (2014) Biodegradation of pyrene by *Phanerochaete chrysosporium* and enzyme activities in soils: Effect of SOM, sterilization and aging. *Journal of Environmental Sciences*. **26**: 1135-1144.

Zhang, S., Ning, A., Zhang, X., Zhao, Y., Yang, X., Wu, K., Yang, S., La, G., Sun, X., Li, X. (2015) Constrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **105**: 228-232

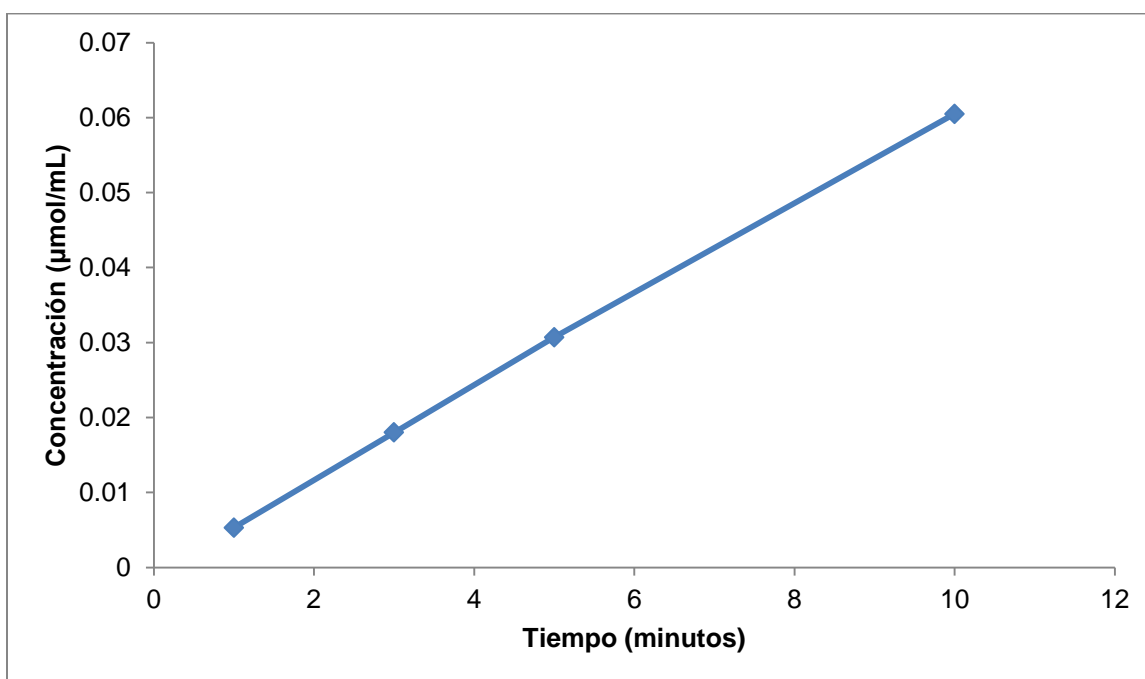
Zhen-Yu, W., Xu, Y., Hao-Yun, W., Jian, Z., Dong-Mei, G., Feng-Min, L., Xing, B. (2012). Biodegradation of Crude Oil in Contaminated Soils by Free and Immobilized Microorganism. *Pedosphere*. **22**: 717-725.

Zhen, Z., Obbard, J. P. (2002) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rote fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 3-9.

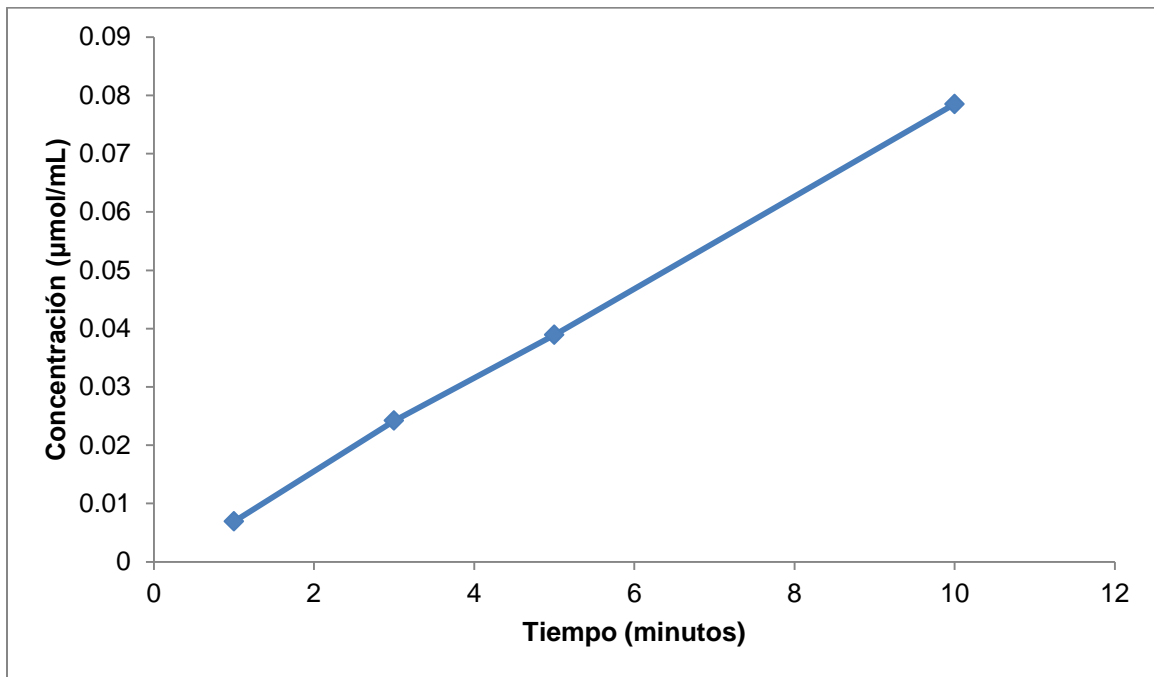
Anexo 1: Gráficas de las diferentes actividades enzimáticas a través del tiempo



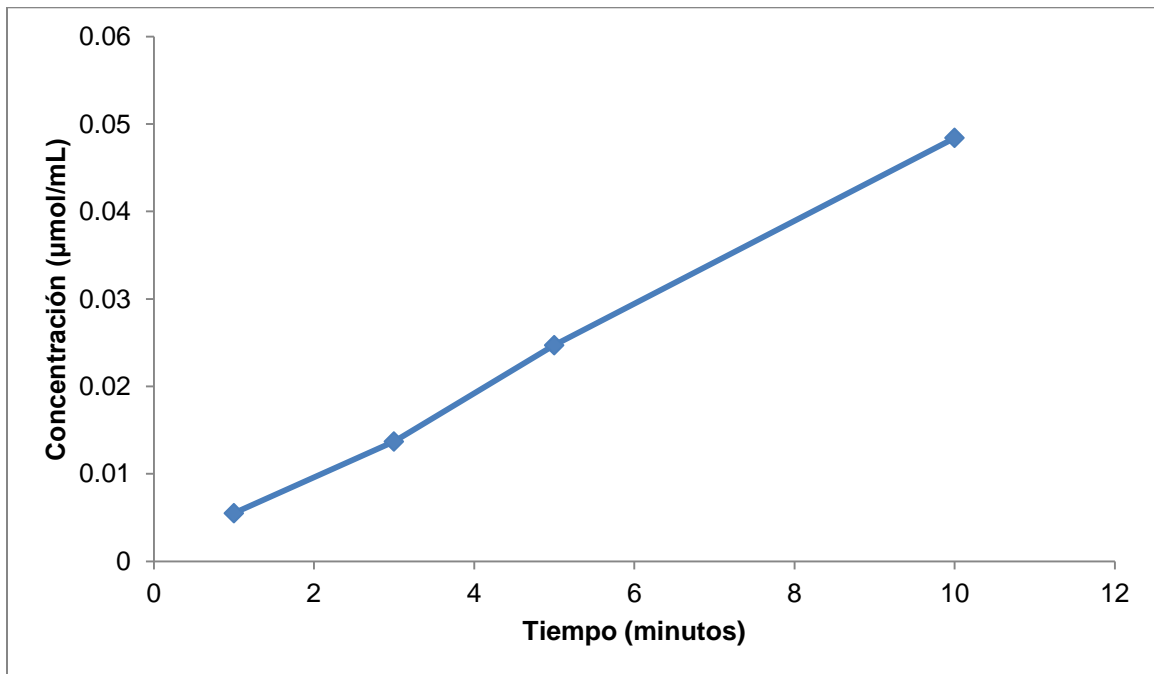
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidase en el momento cero para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (1Ph)



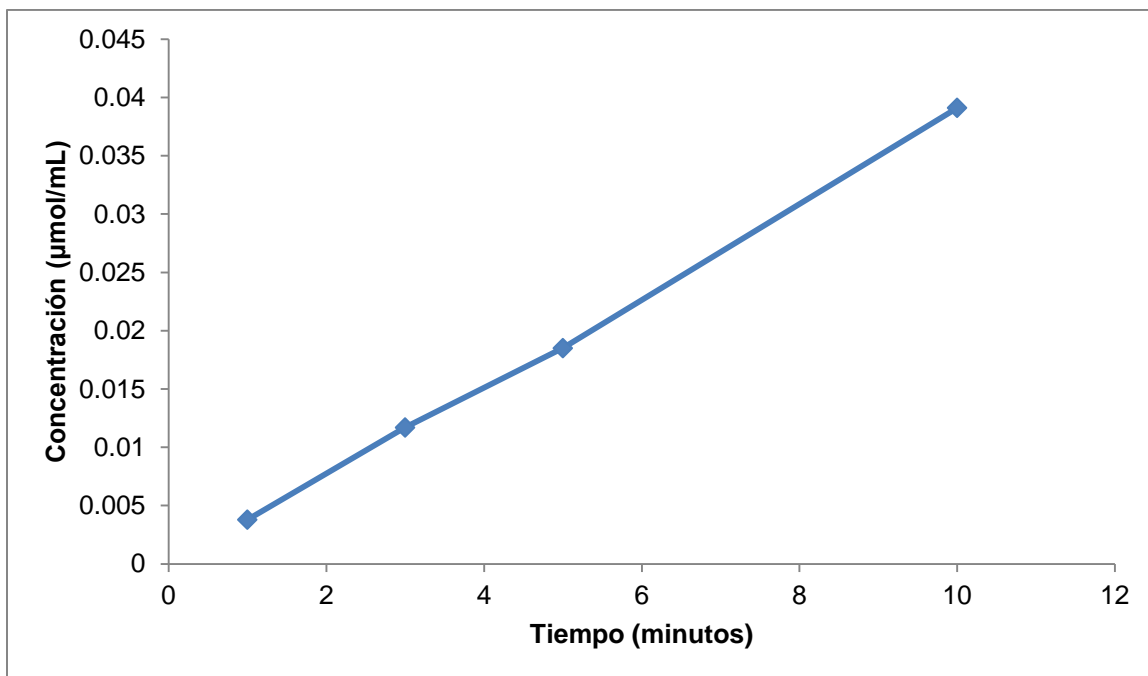
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidase en el momento dos para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (1Ph)



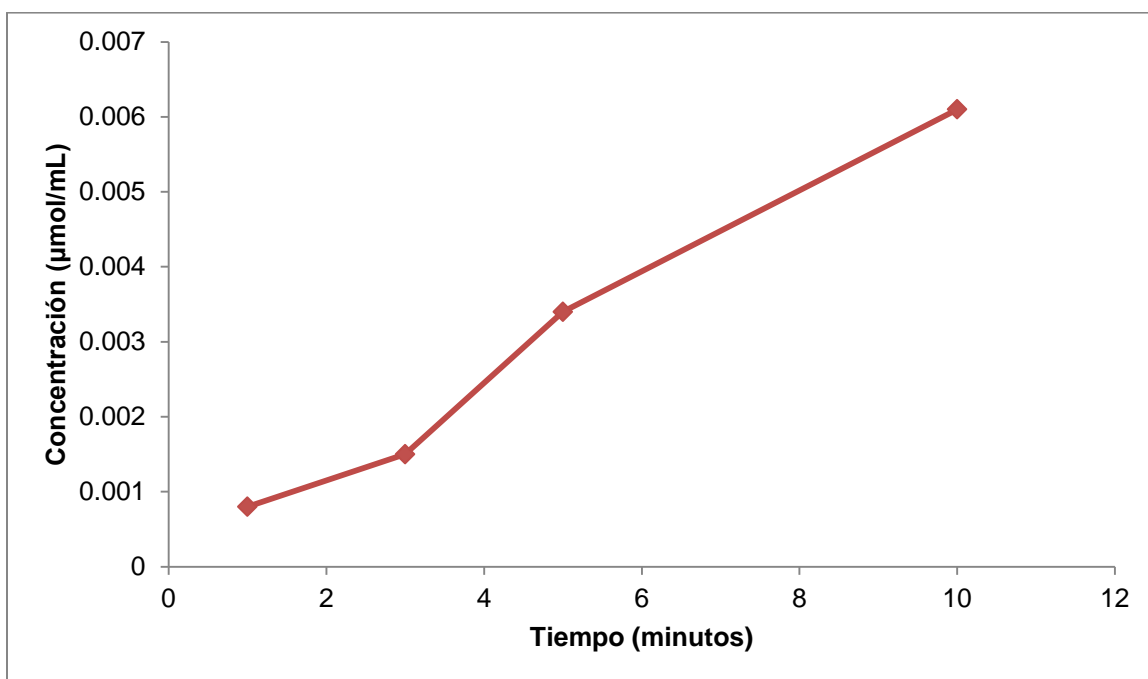
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (**1Ph**)



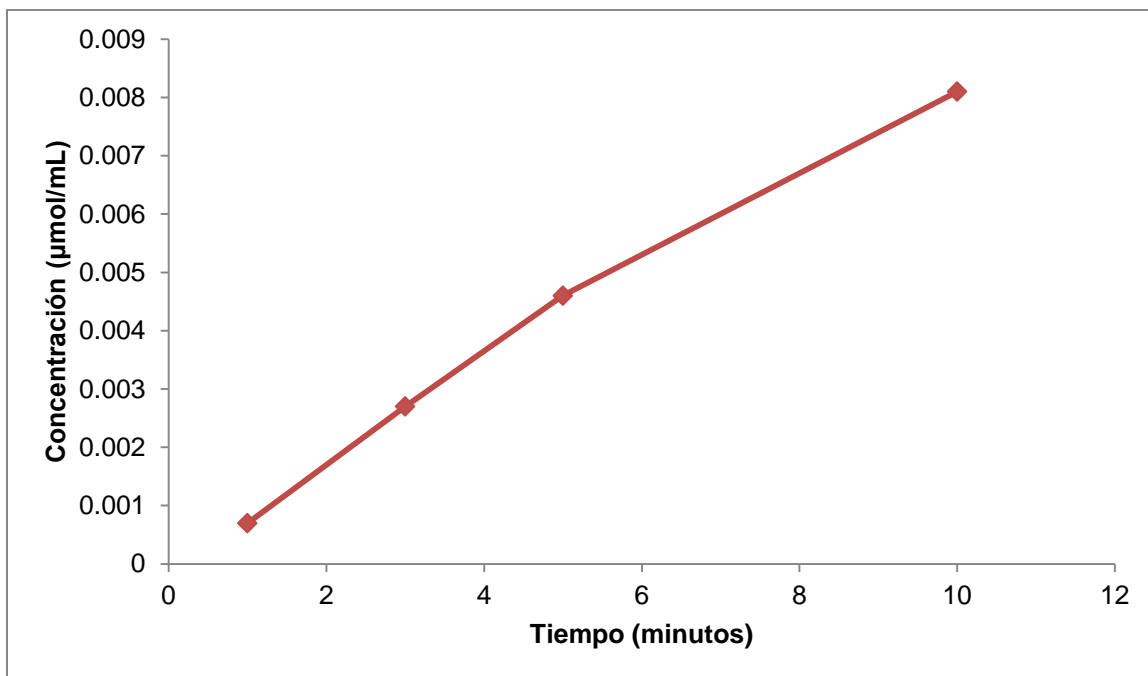
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (**1Ph**)



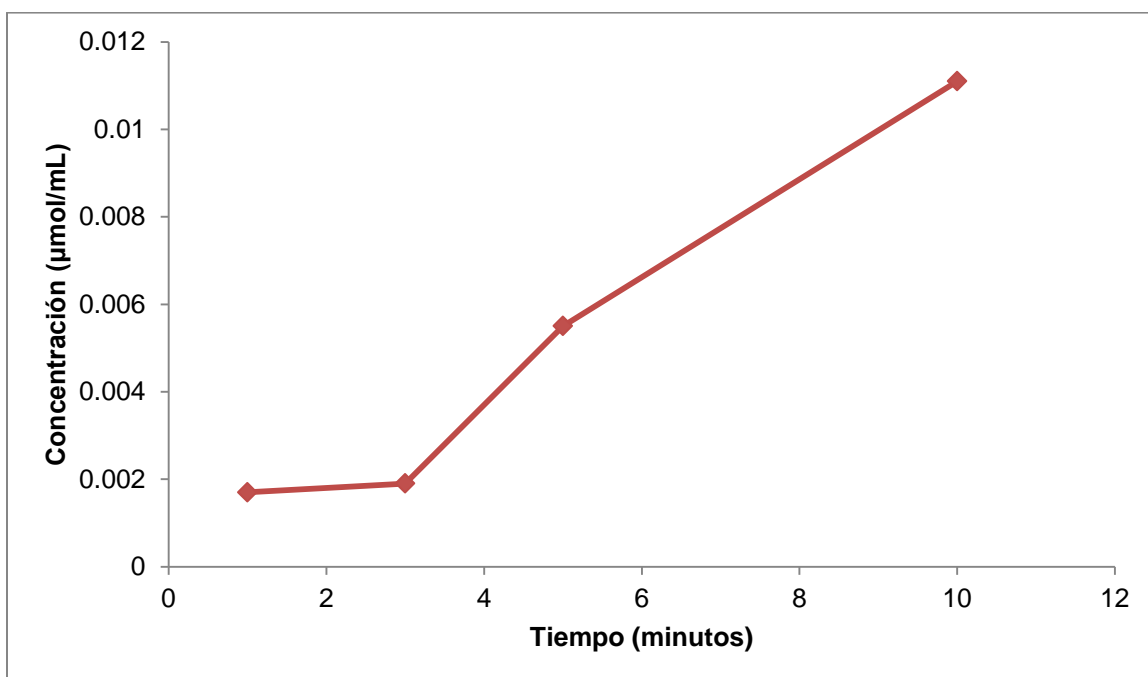
Gráfica de la actividad de la Manganeso Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (1Ph)



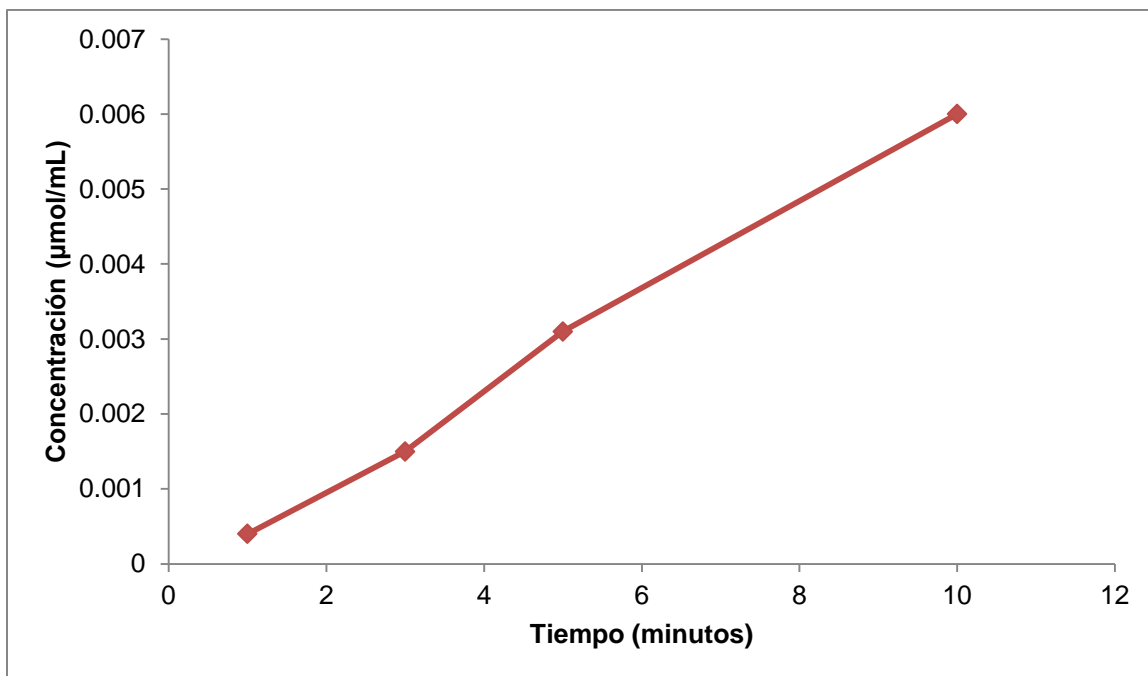
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cero para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (1Ph)



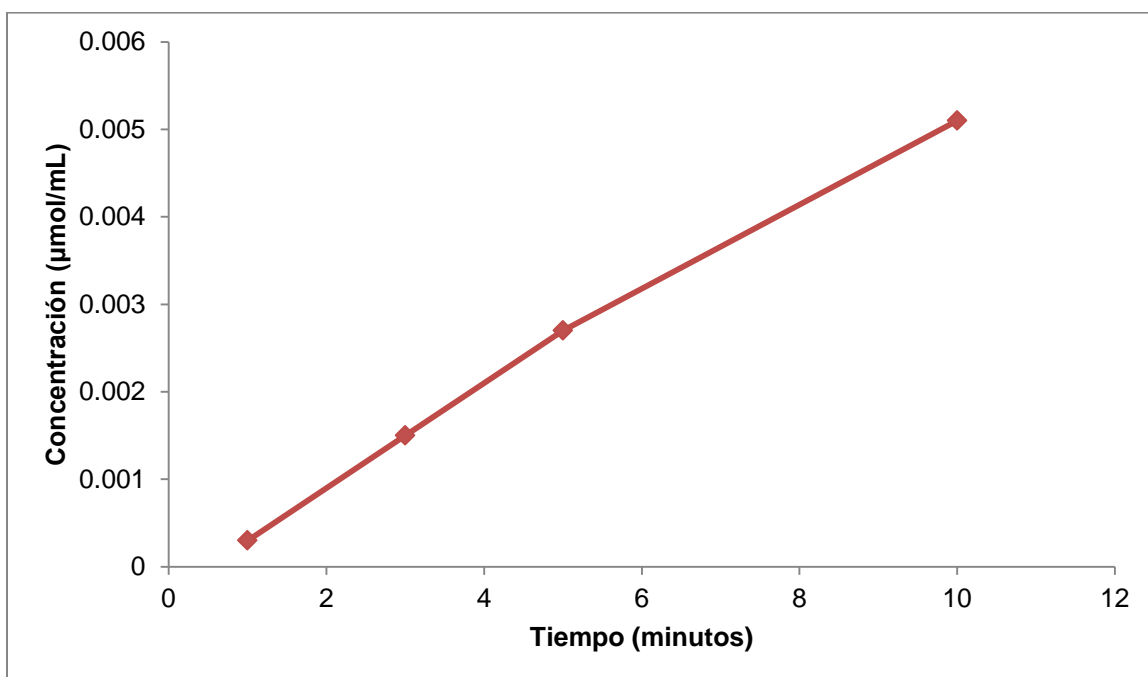
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento dos para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (**1Ph**)



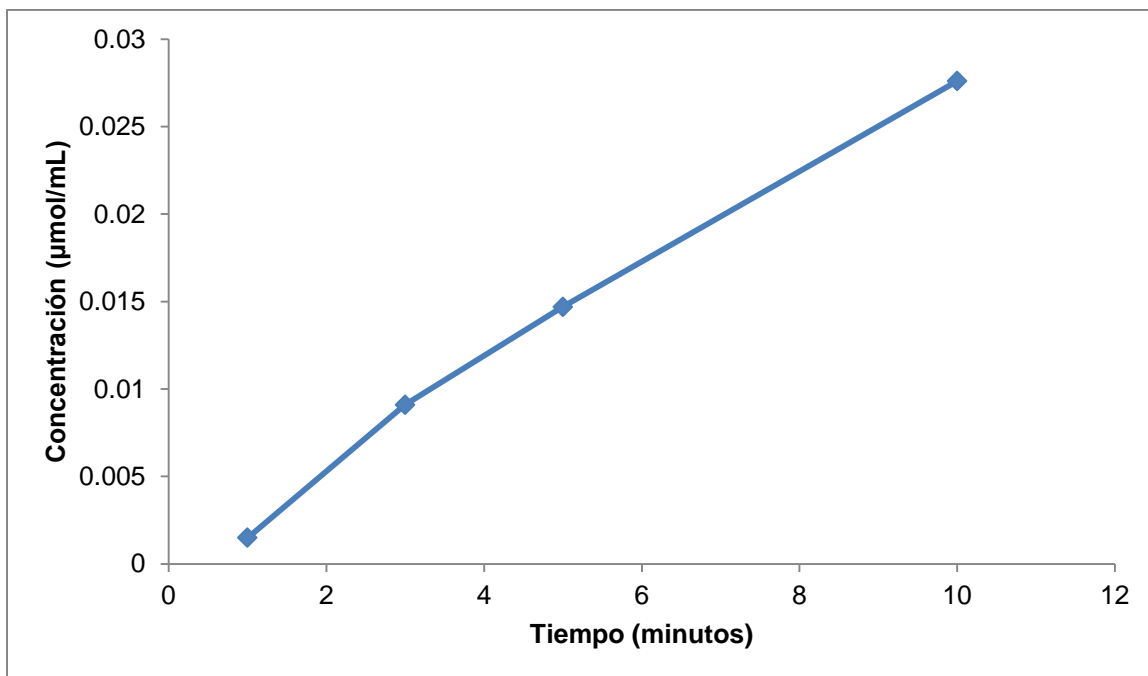
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (**1Ph**)



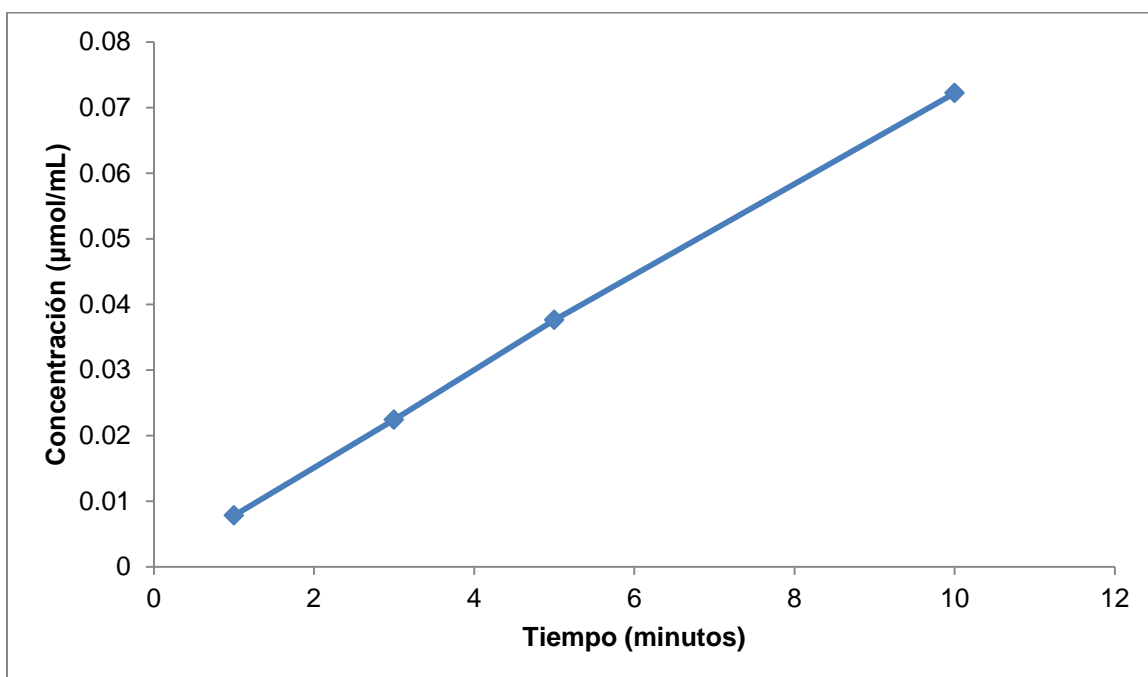
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (**1Ph**)



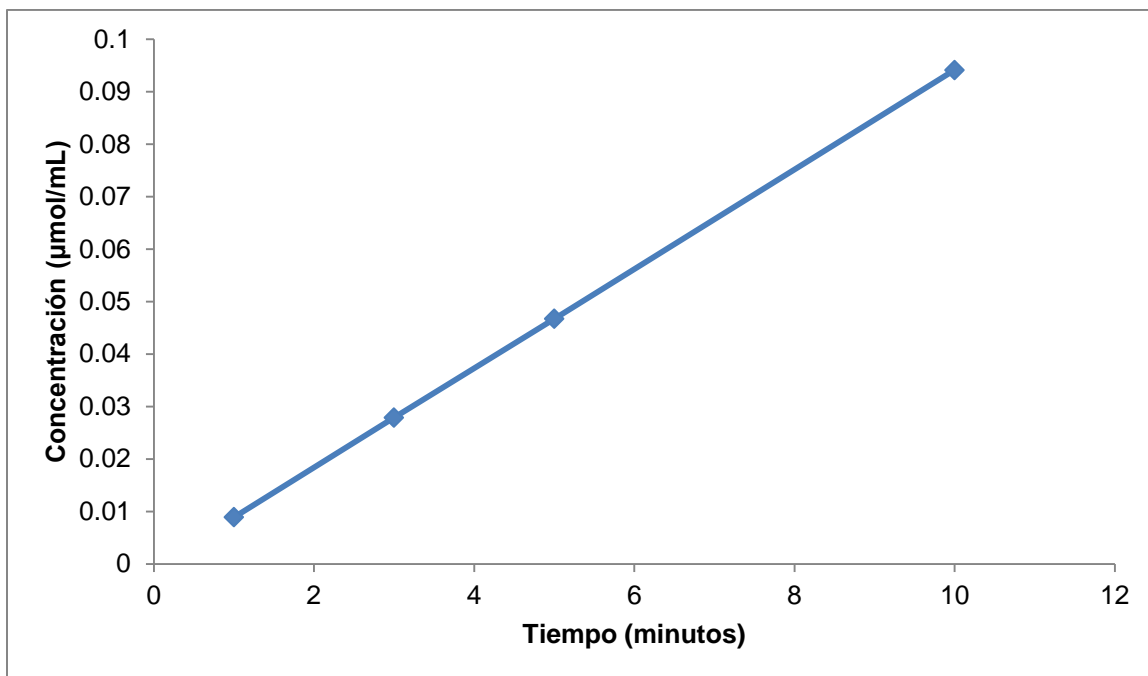
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en madera (**1Ph**)



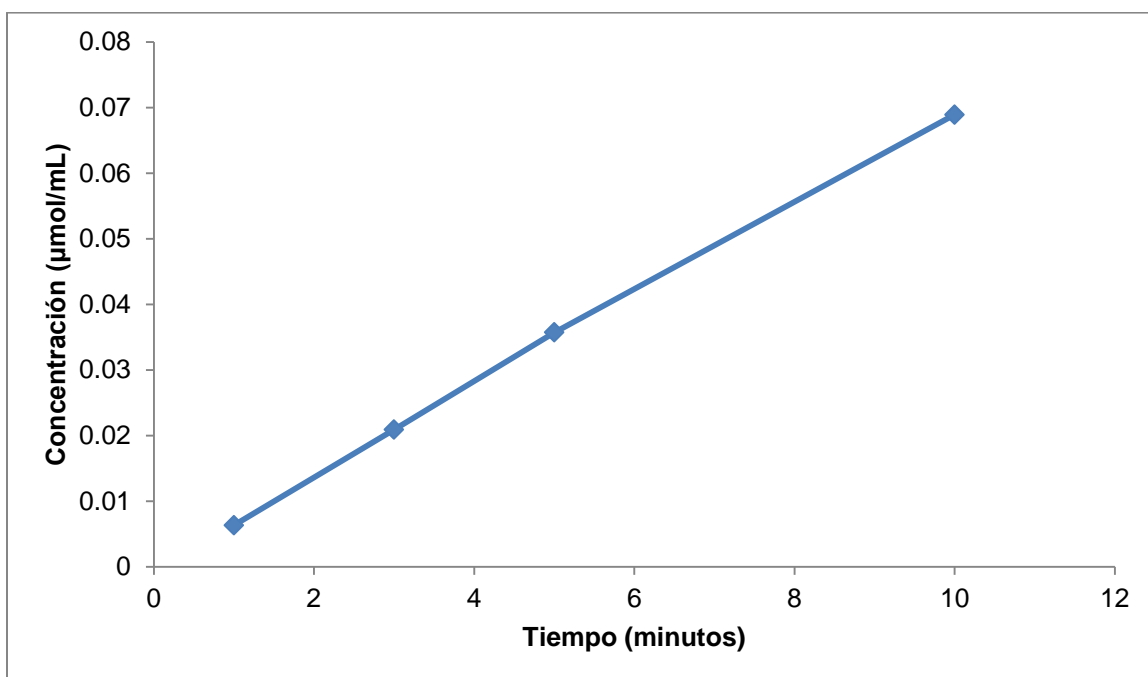
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento cero para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



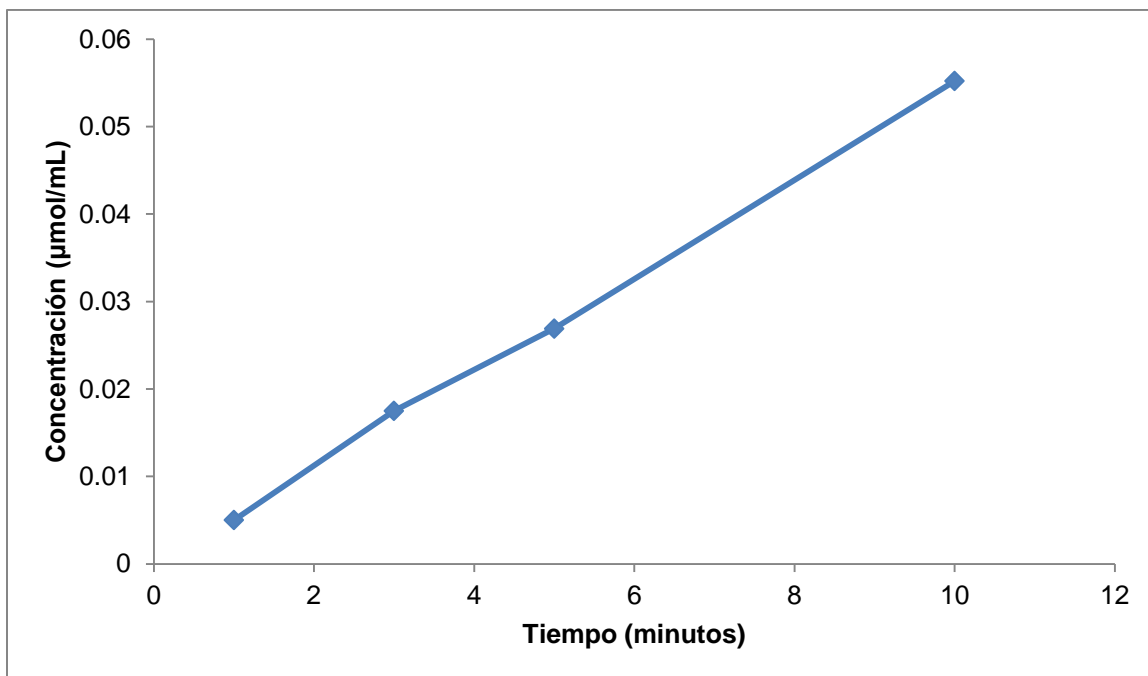
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento dos para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



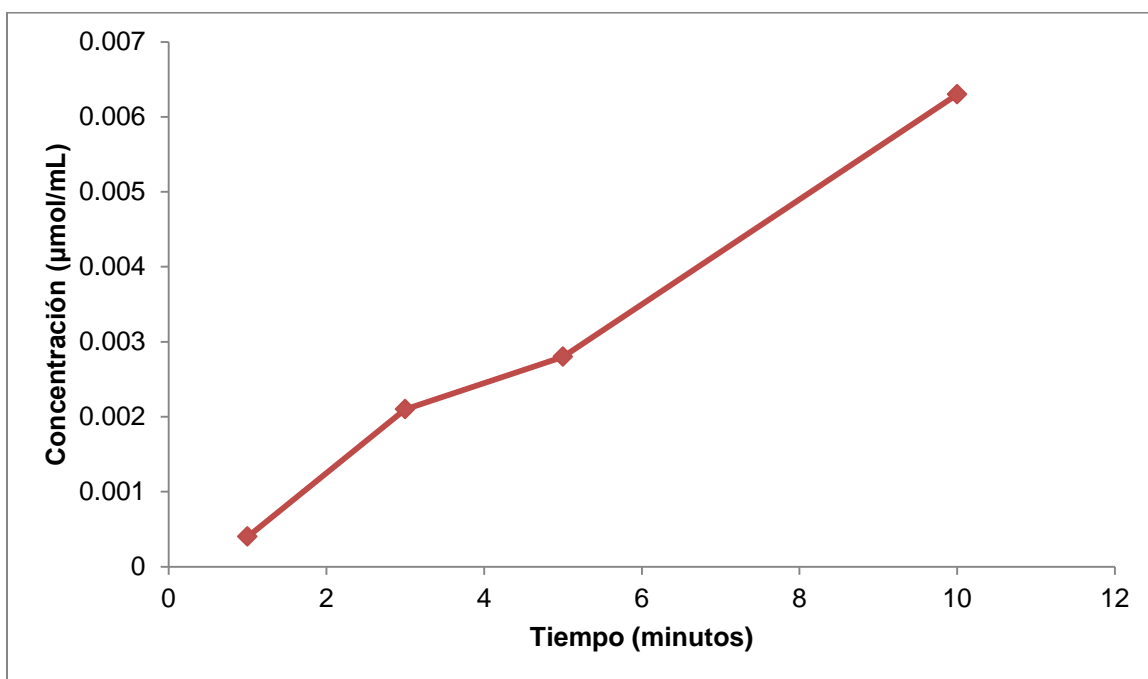
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (**2Ph**)



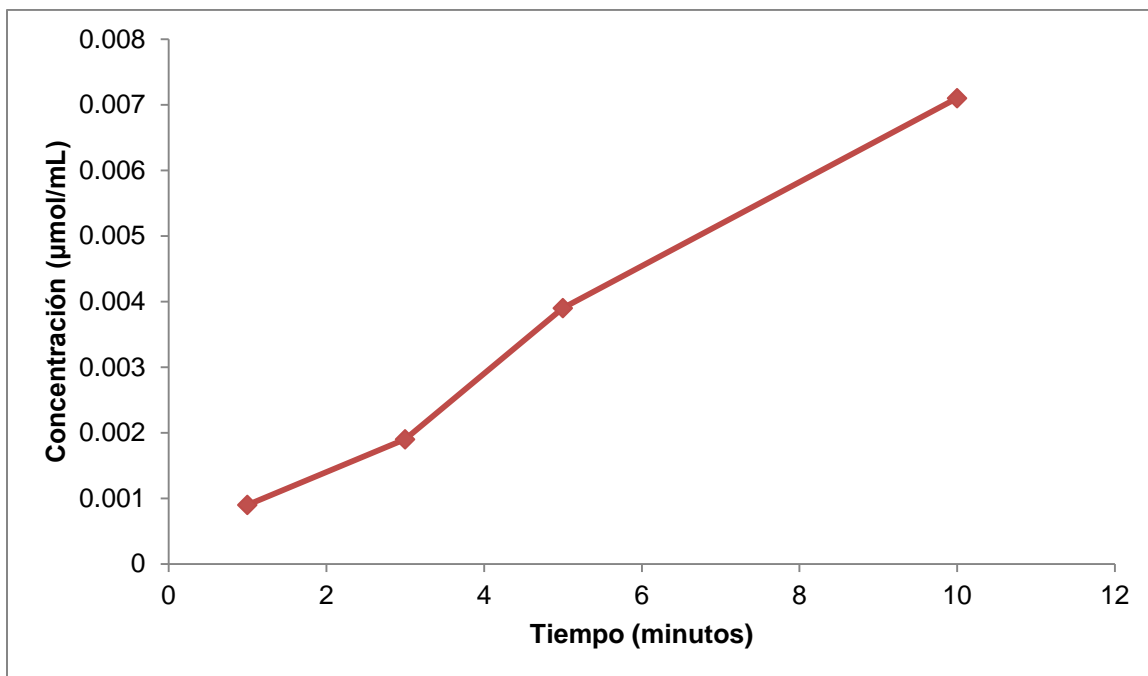
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (**2Ph**)



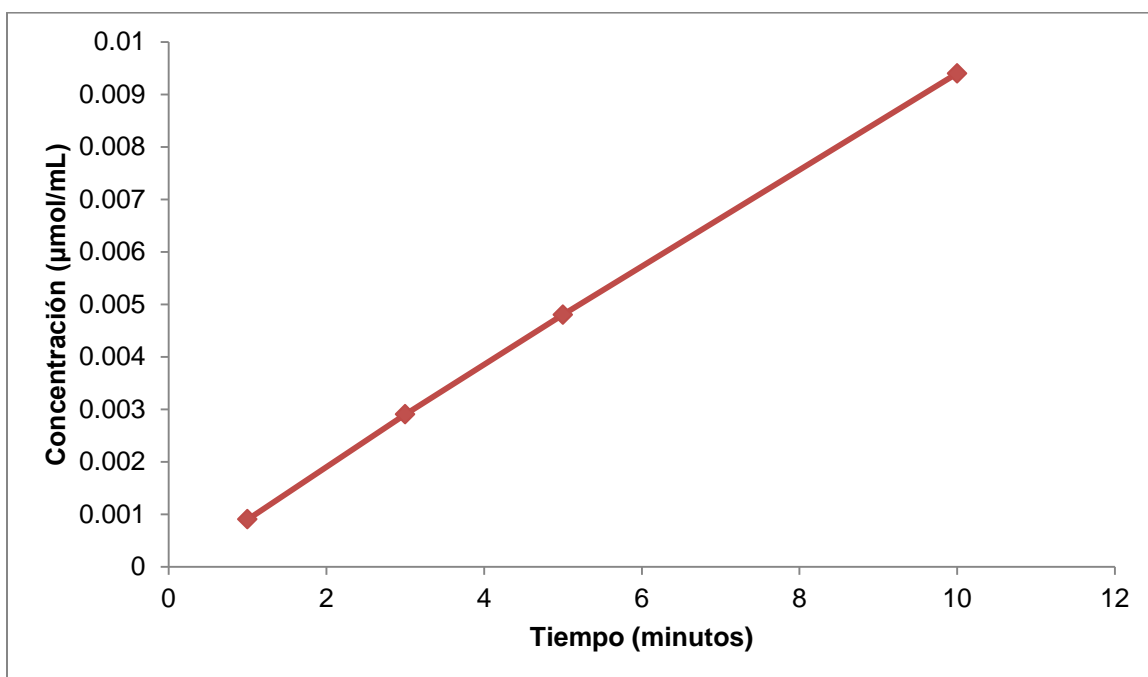
Gráfica de la actividad de la Manganeso Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



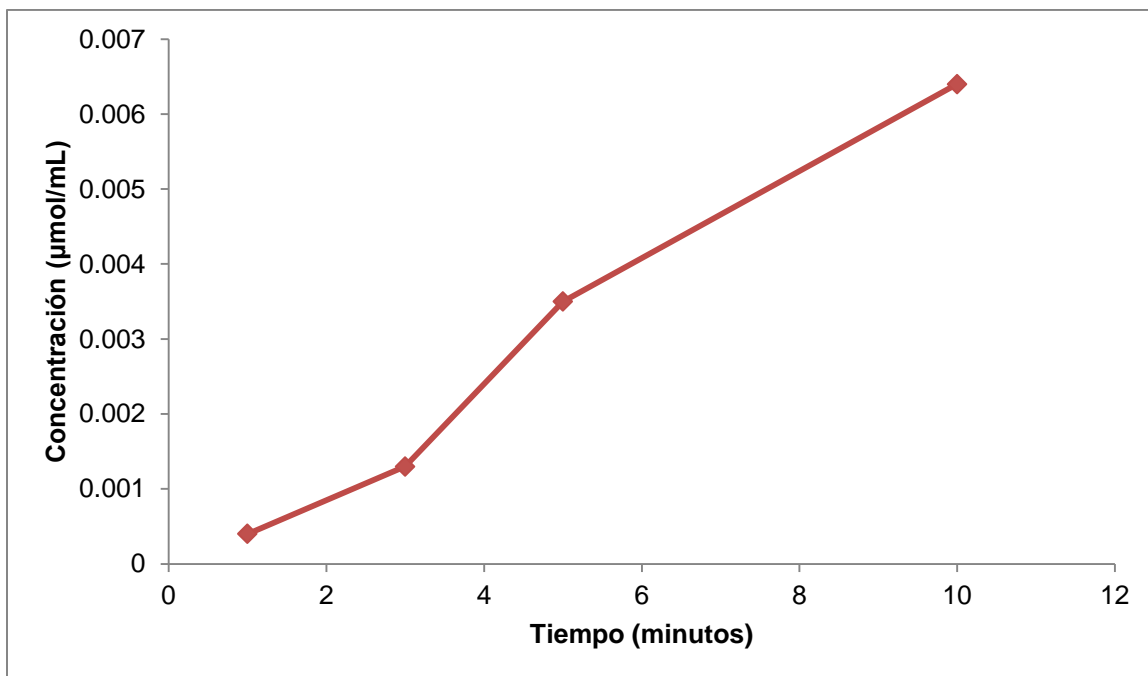
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cero para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



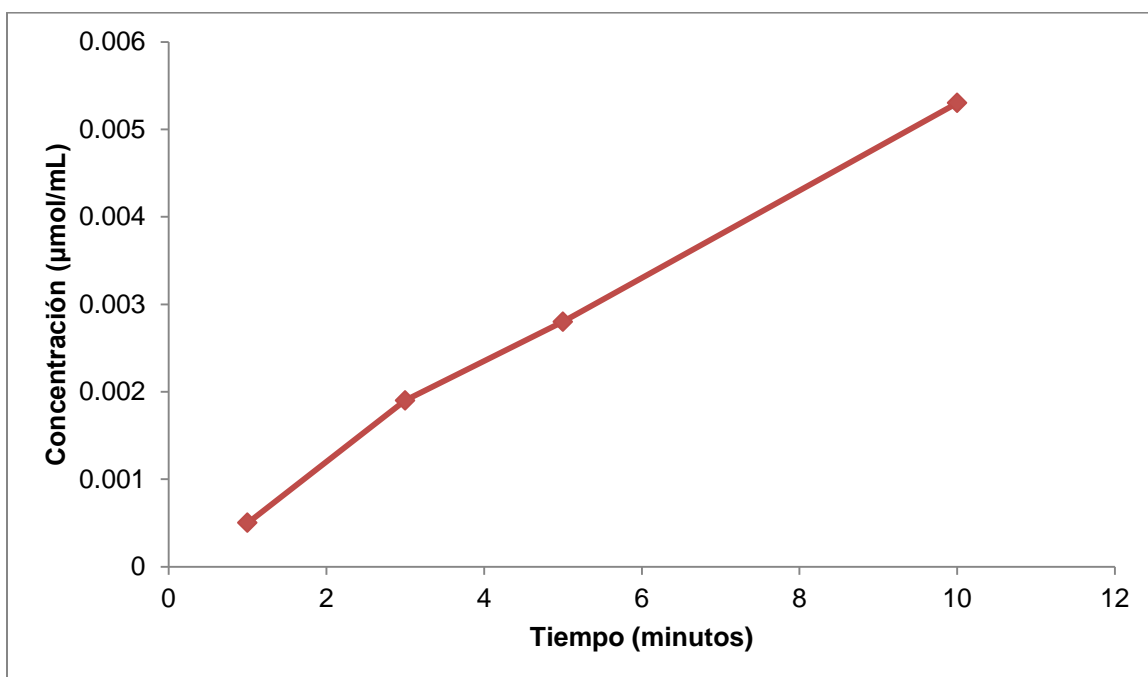
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento dos para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



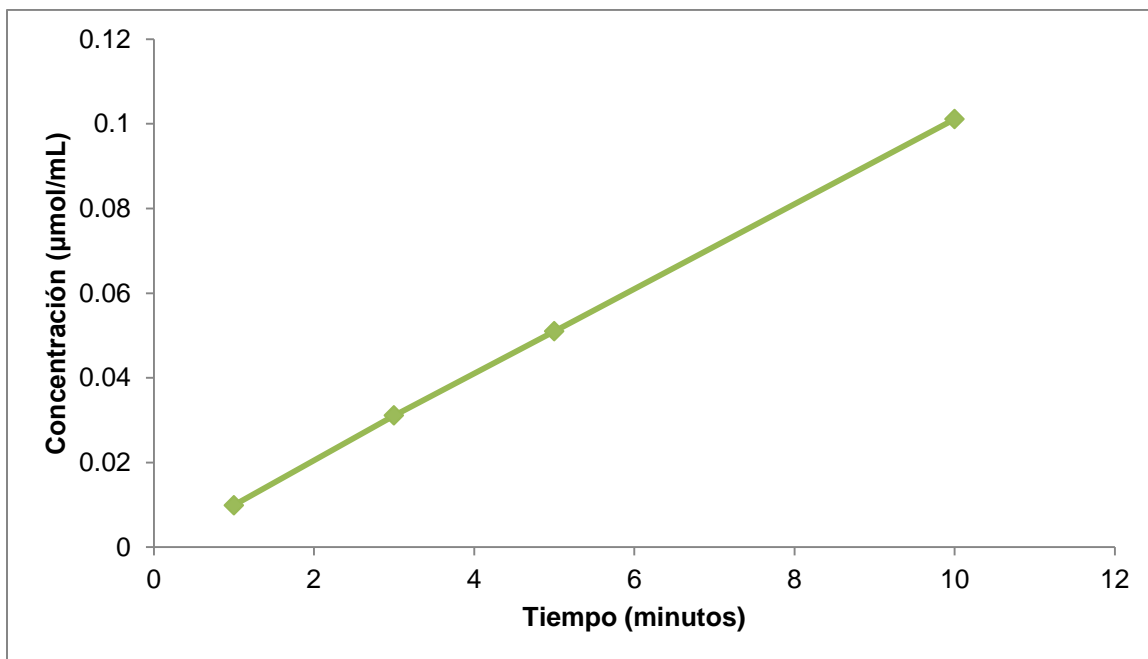
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



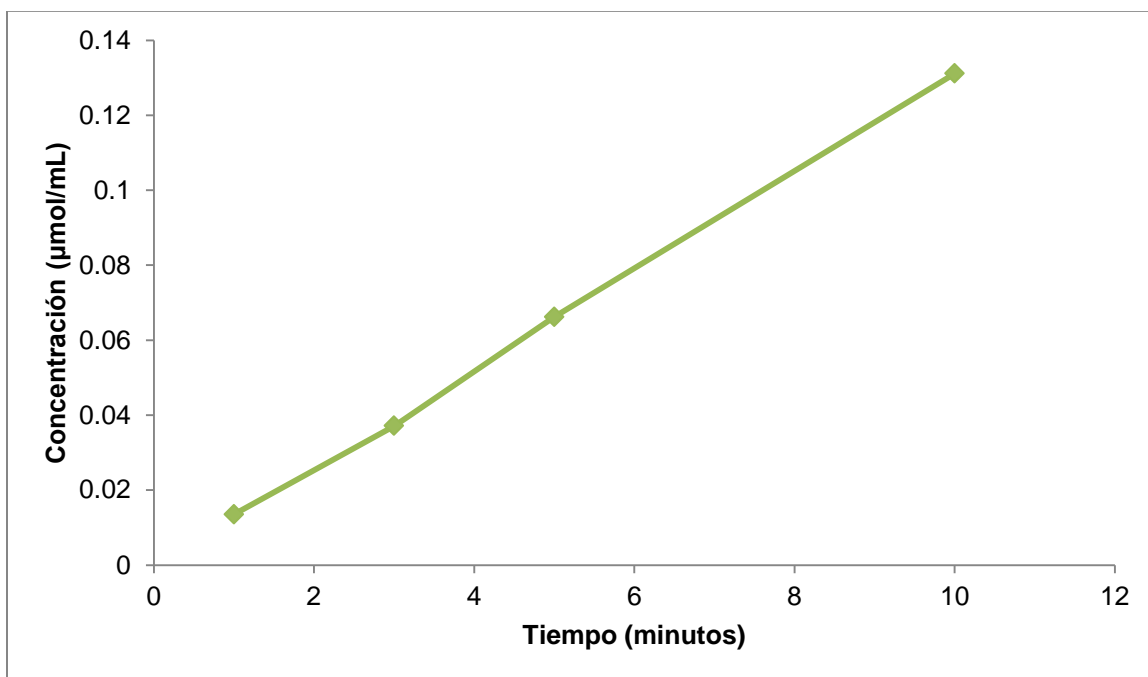
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



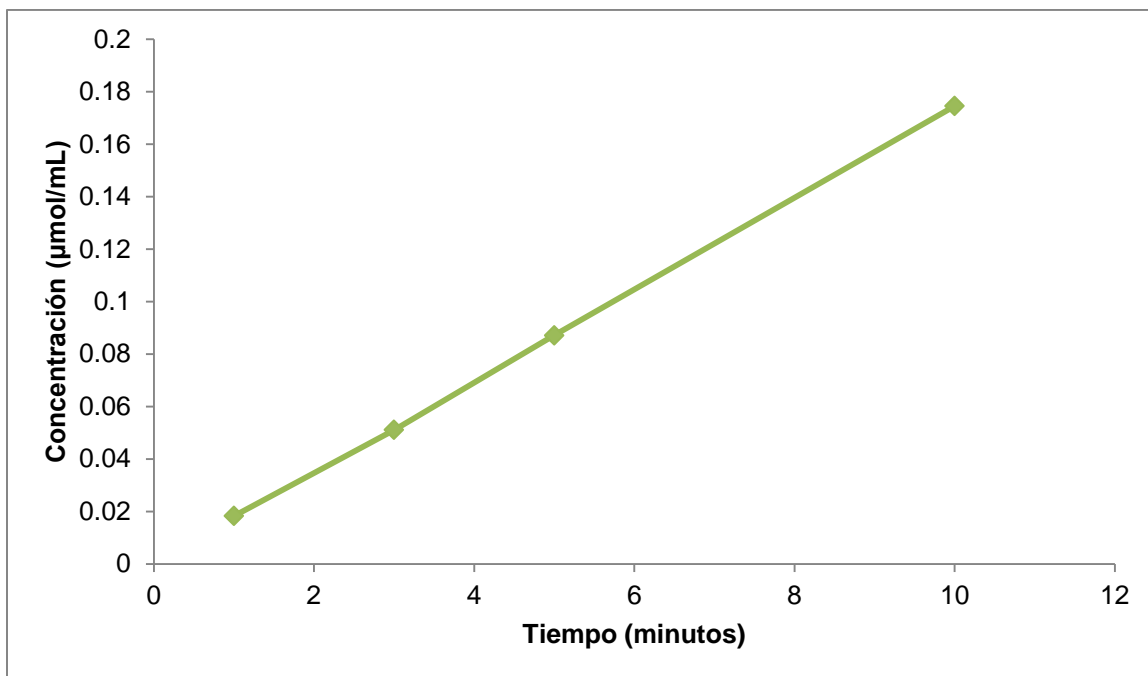
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. chrysosporium* inmovilizado en olote (2Ph)



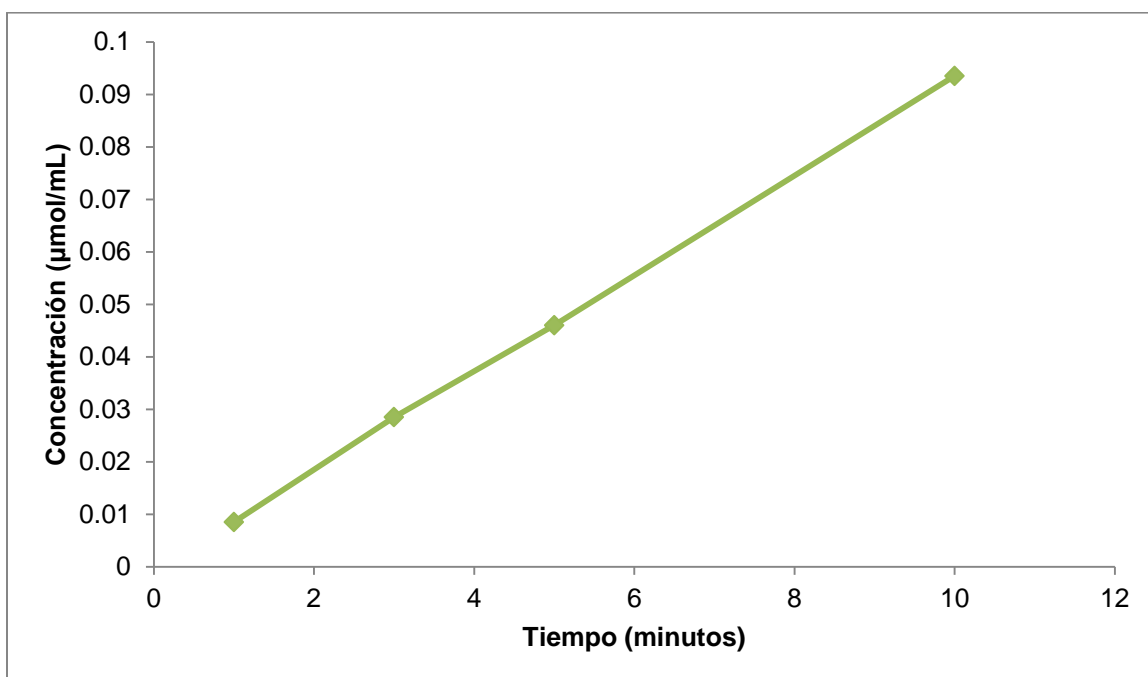
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento cero para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



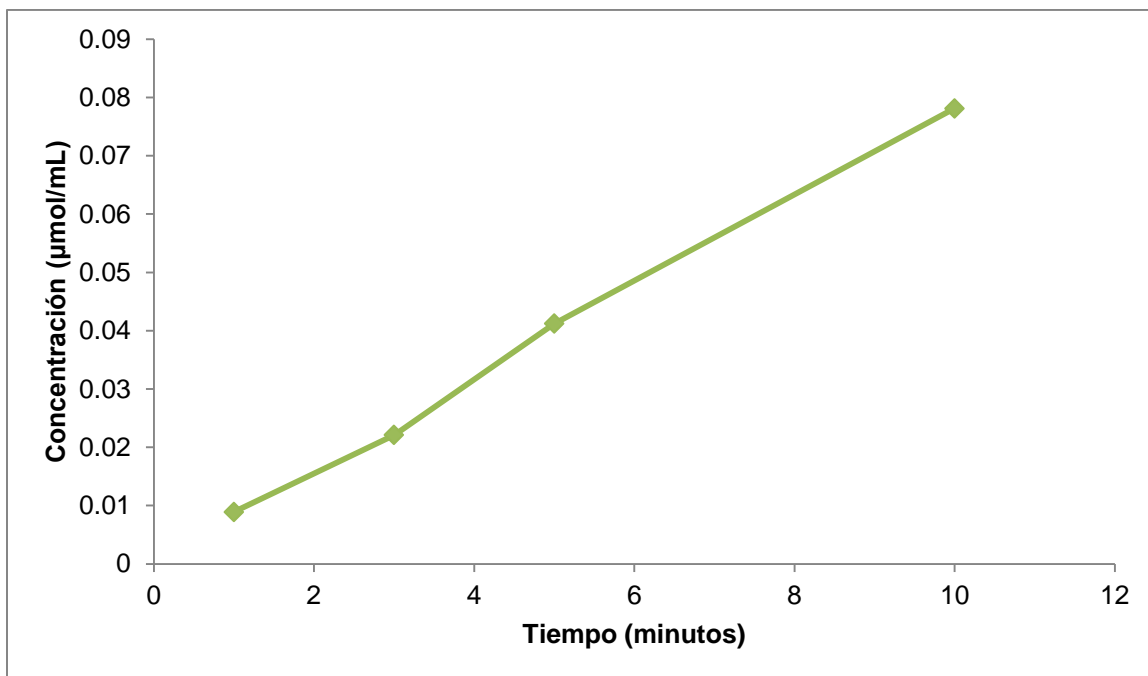
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento dos para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



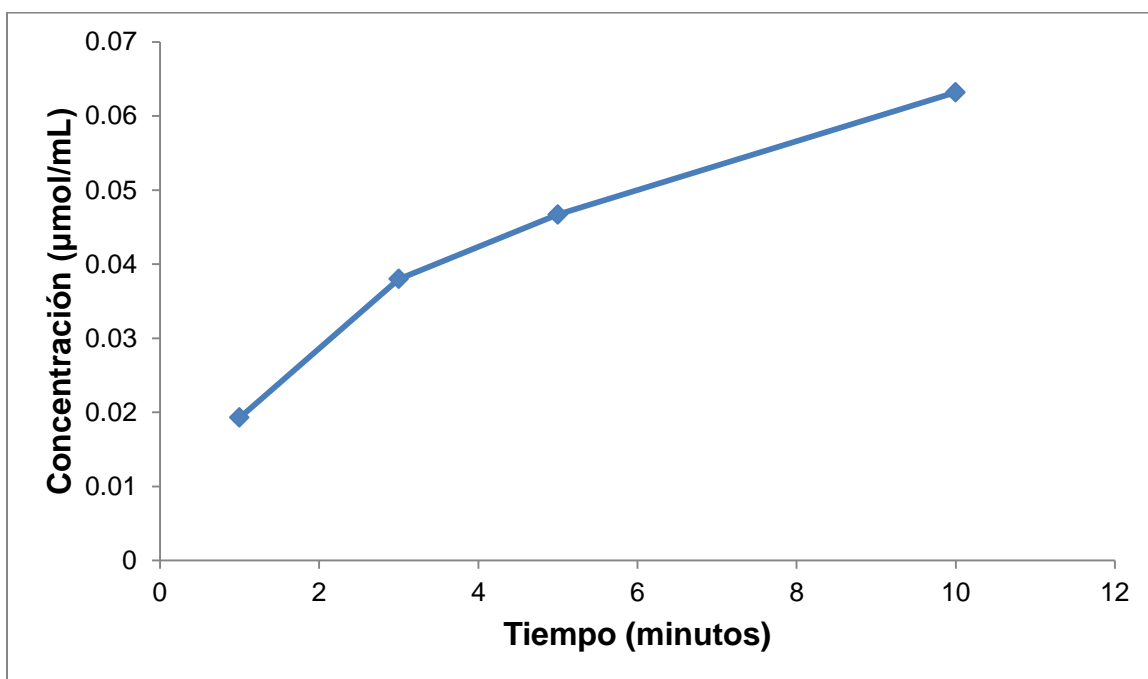
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento tres para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



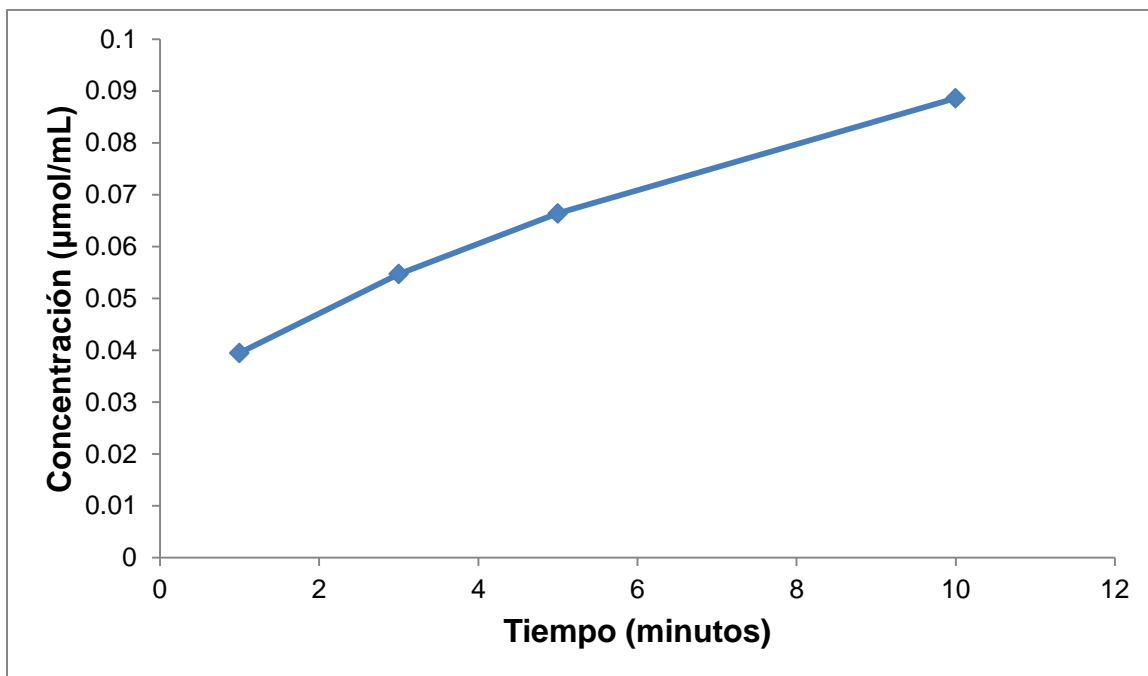
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento cuatro para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



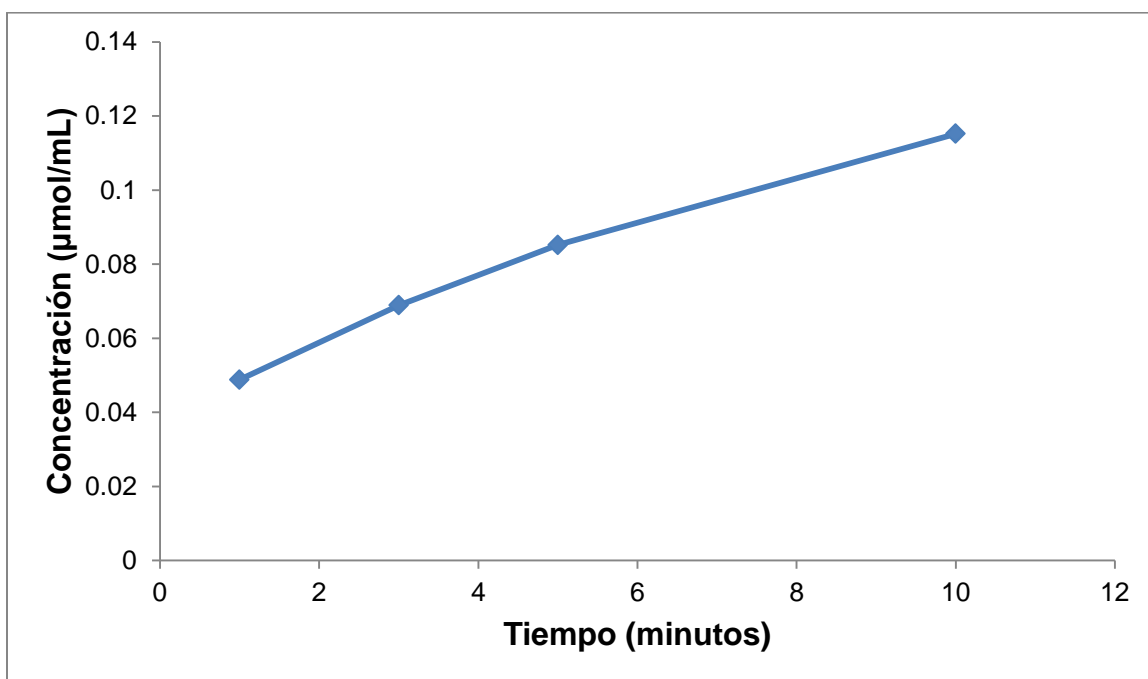
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento seis para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



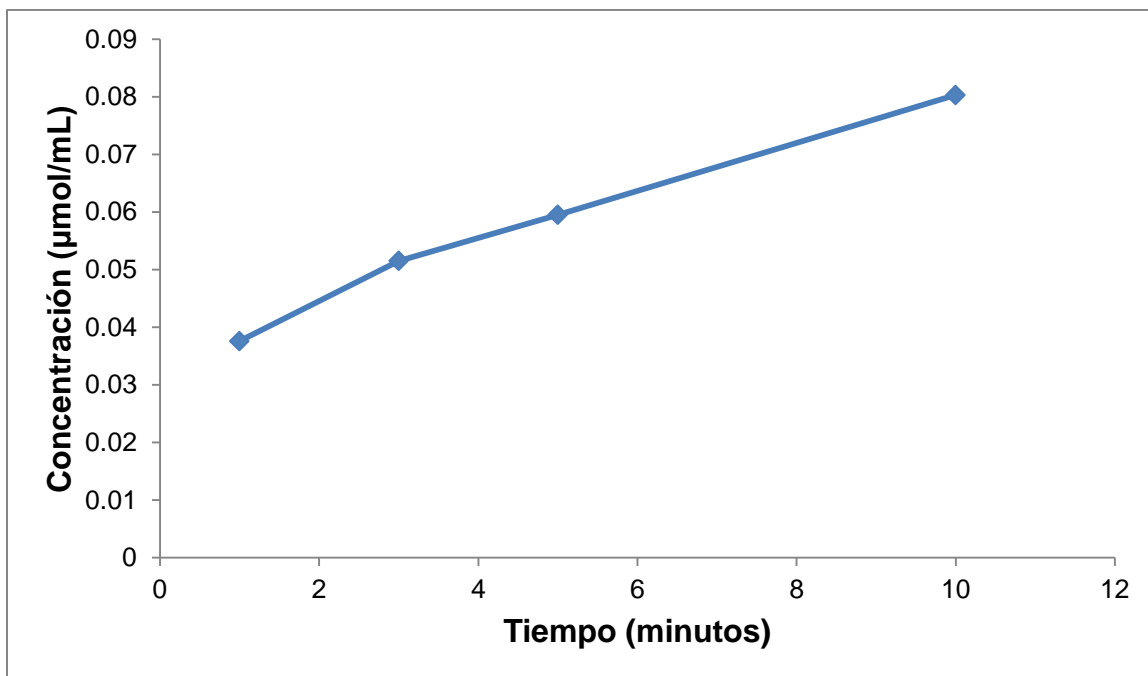
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento cero para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



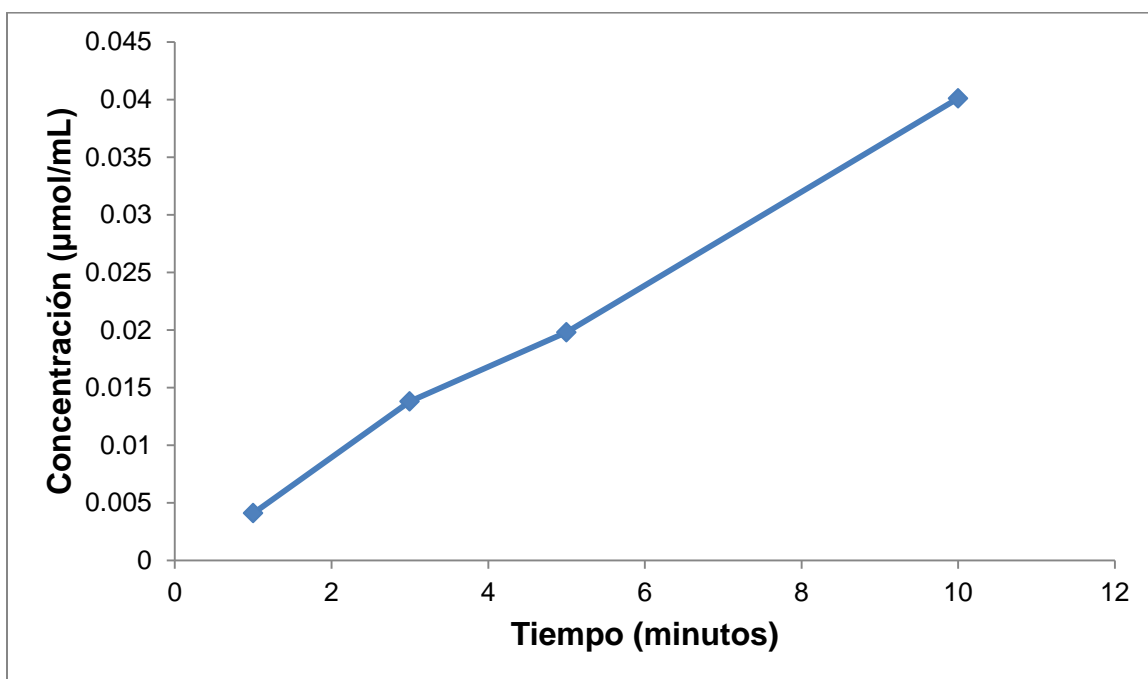
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento dos para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



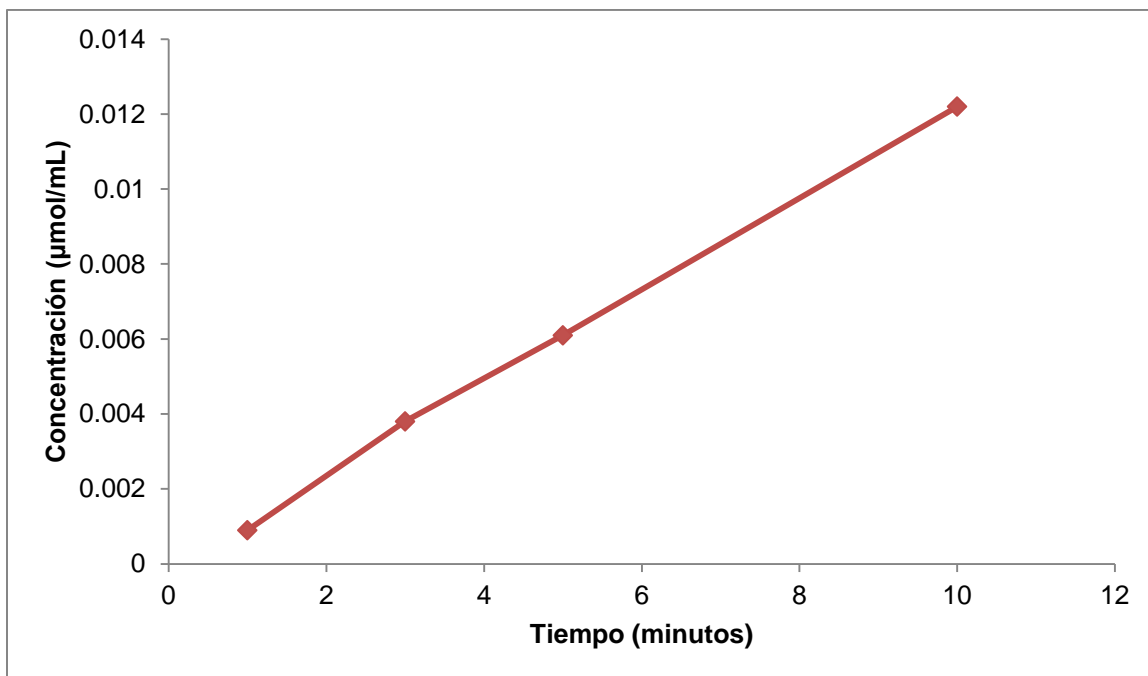
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



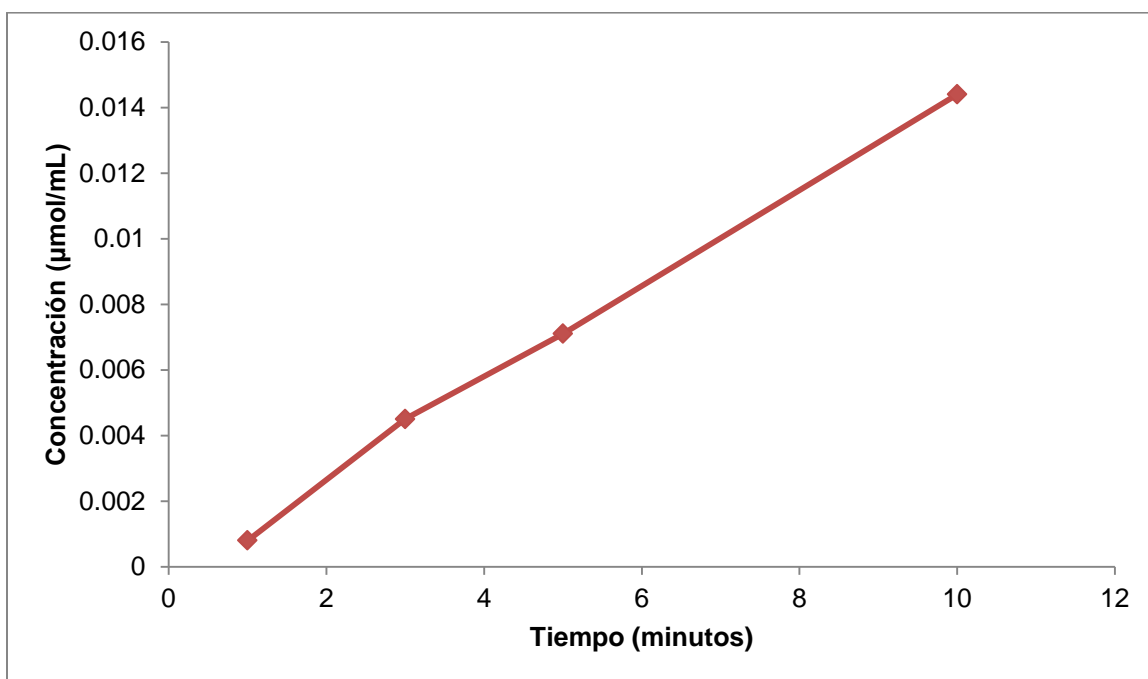
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1**Pc**)



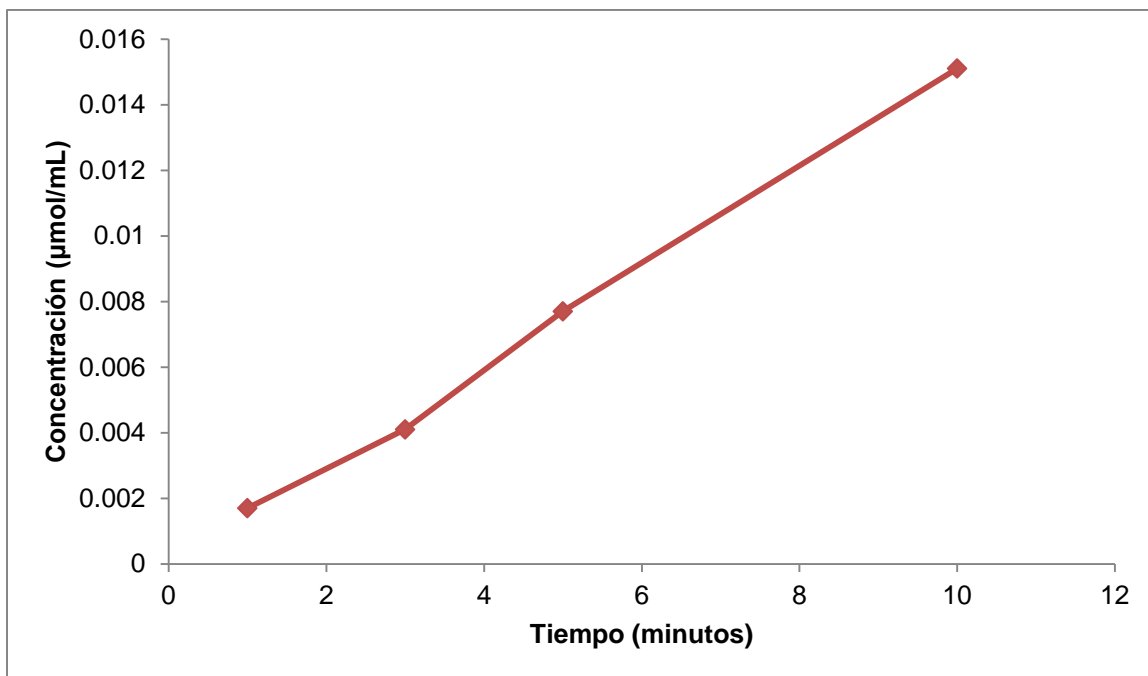
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1**Pc**)



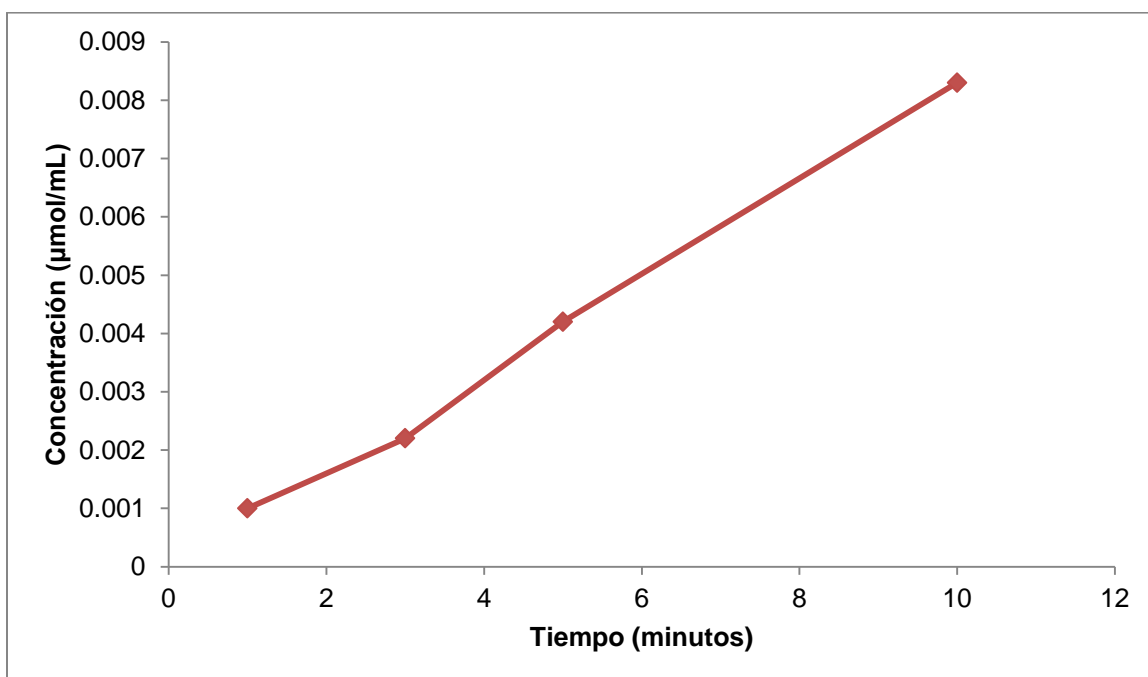
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cero para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



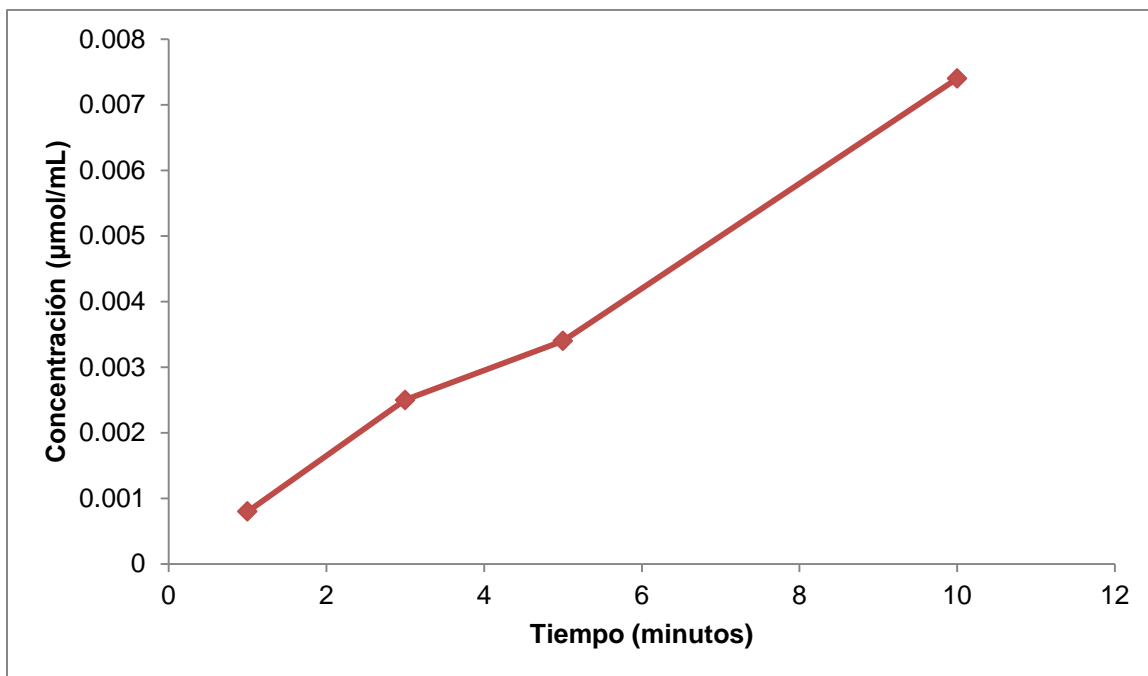
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento dos para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1Pc)



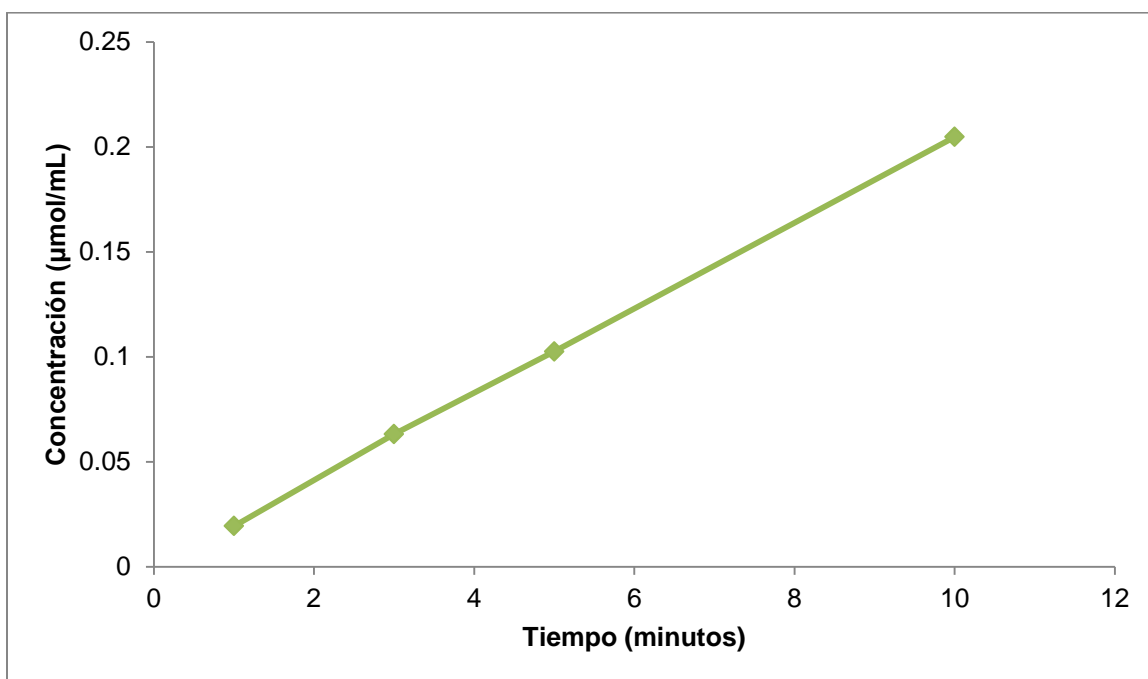
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1**Pc**)



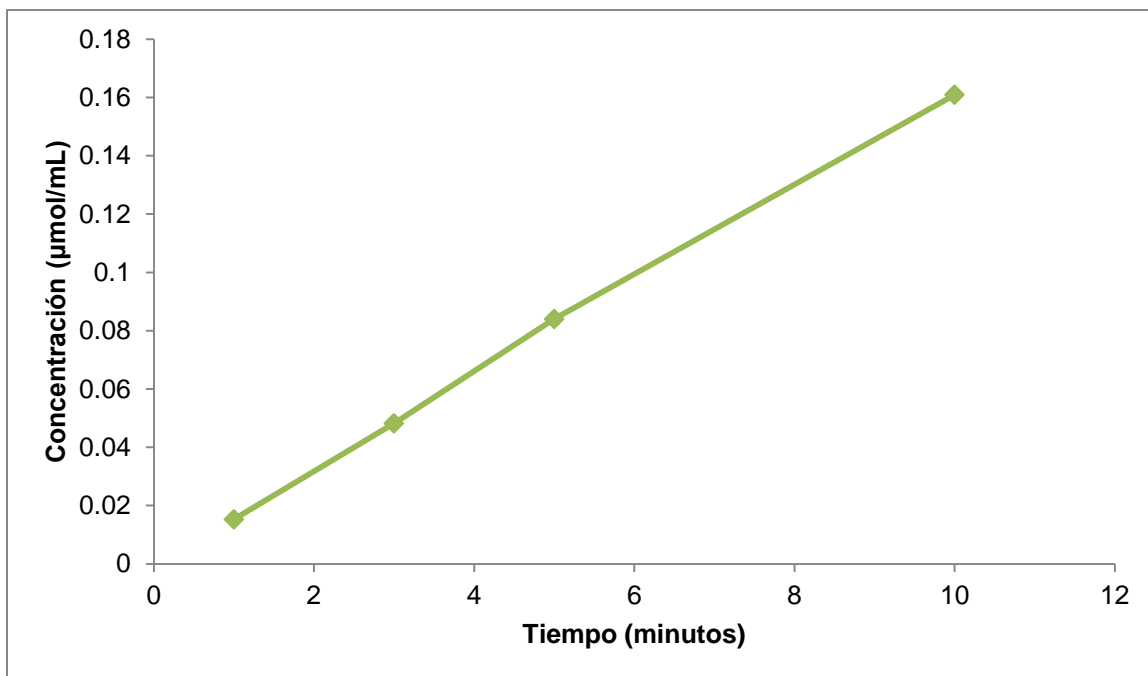
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1**Pc**)



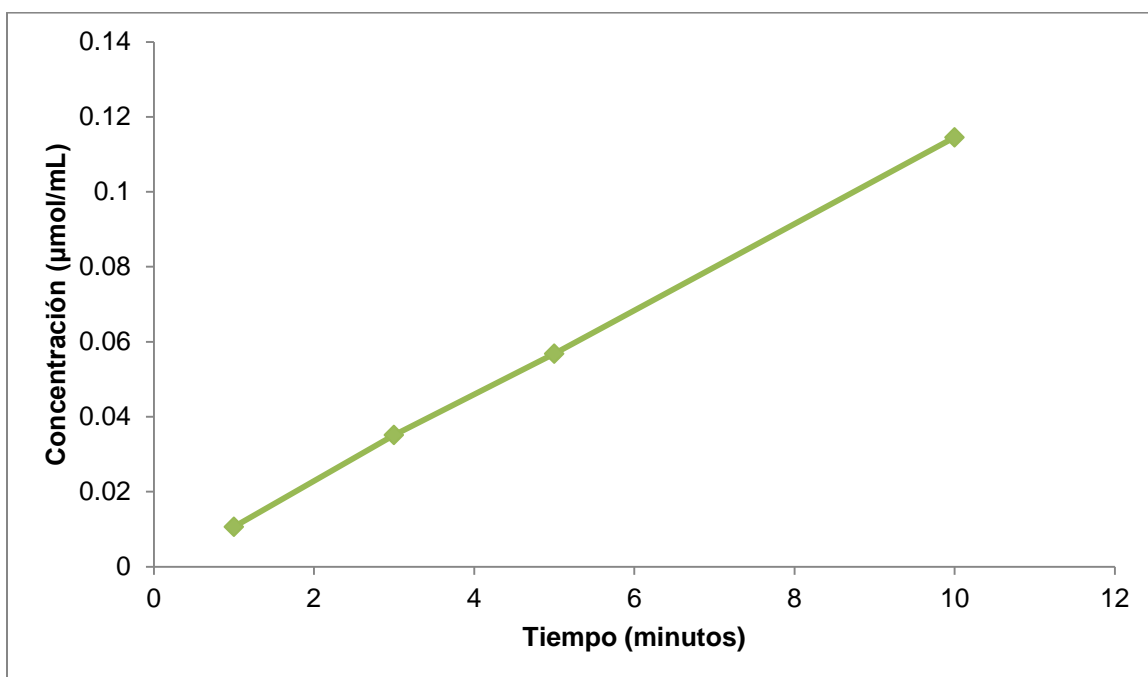
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en madera (1**Pc**)



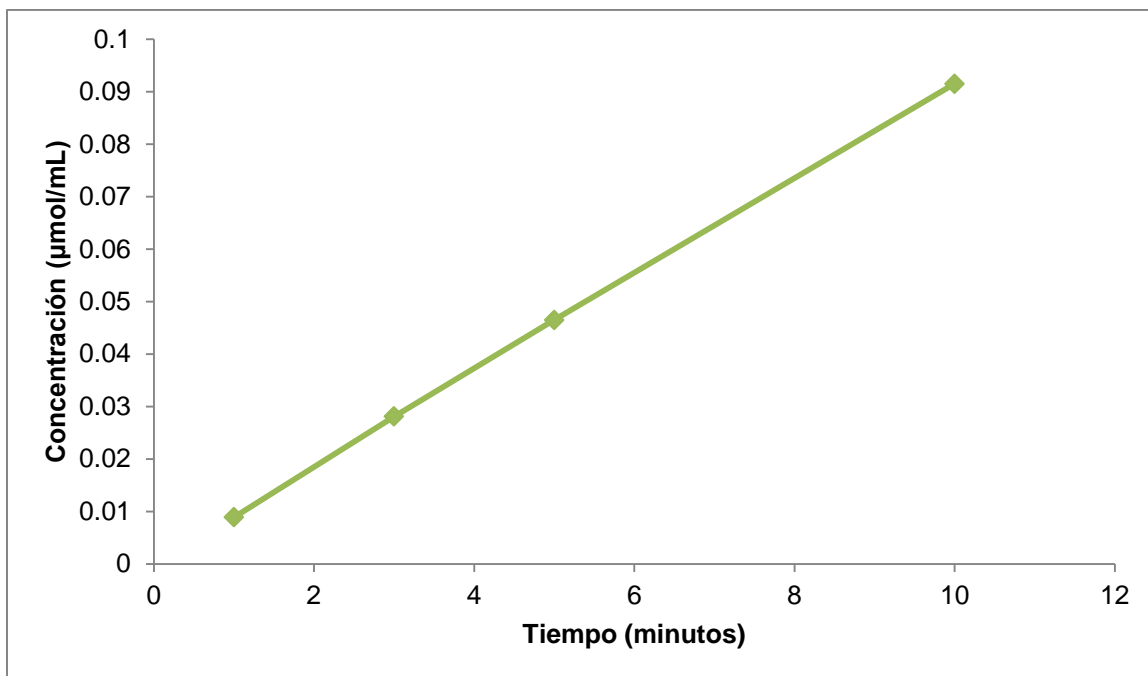
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento cero para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (2**Pc**)



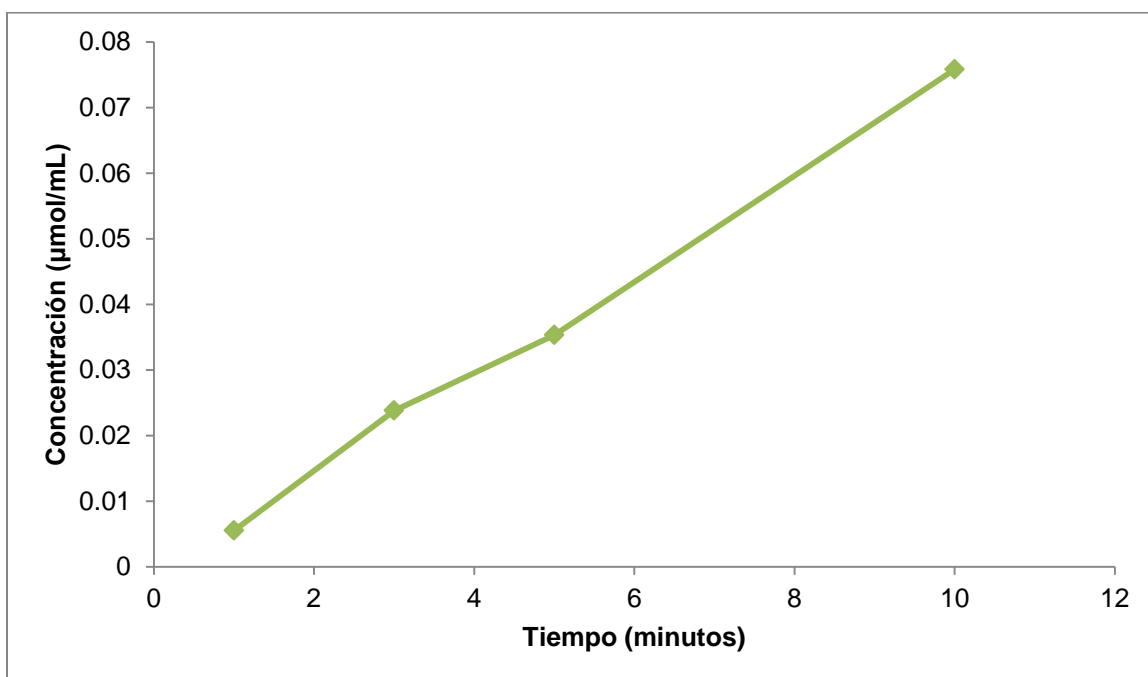
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento dos para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



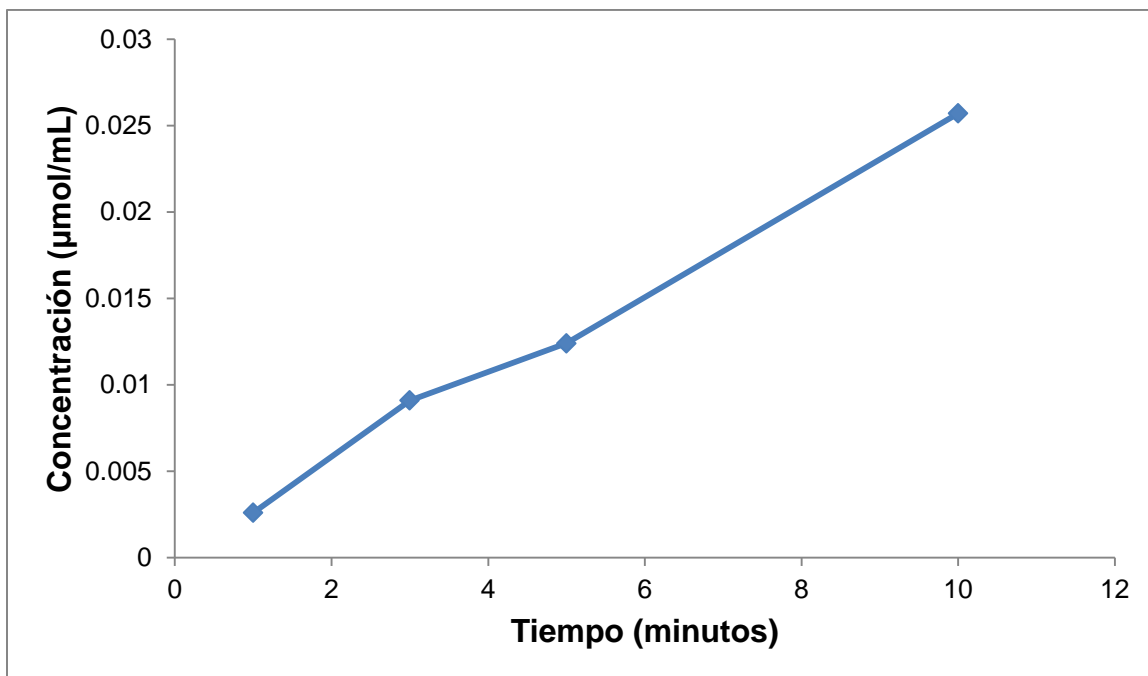
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento tres para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



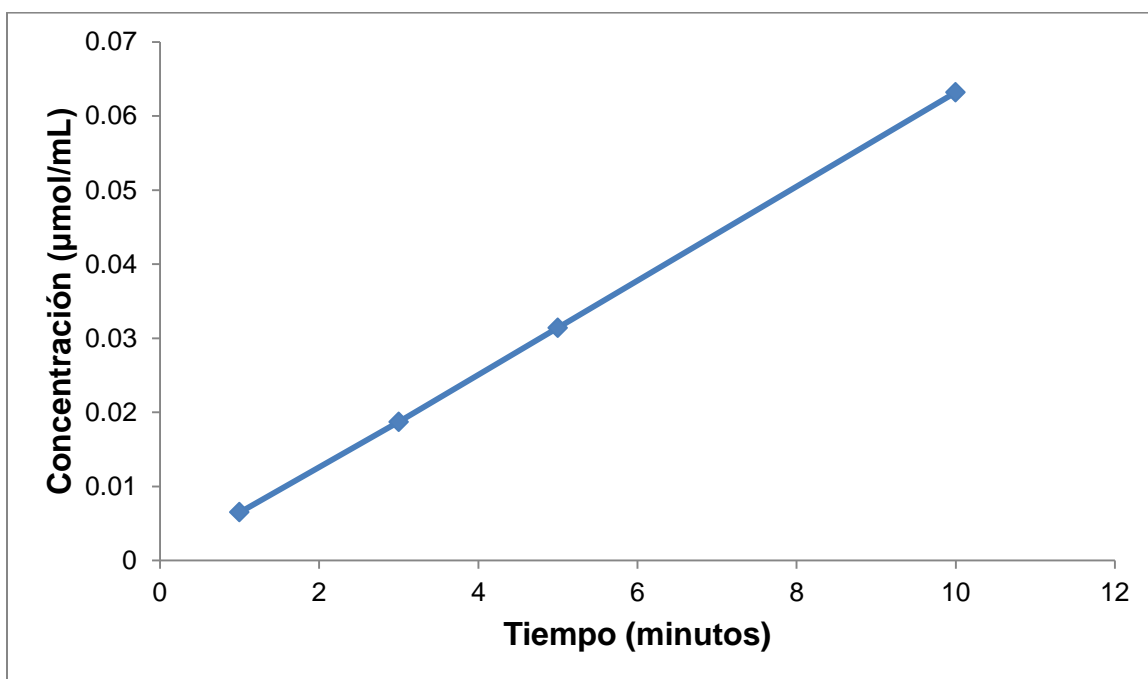
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento cuatro para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



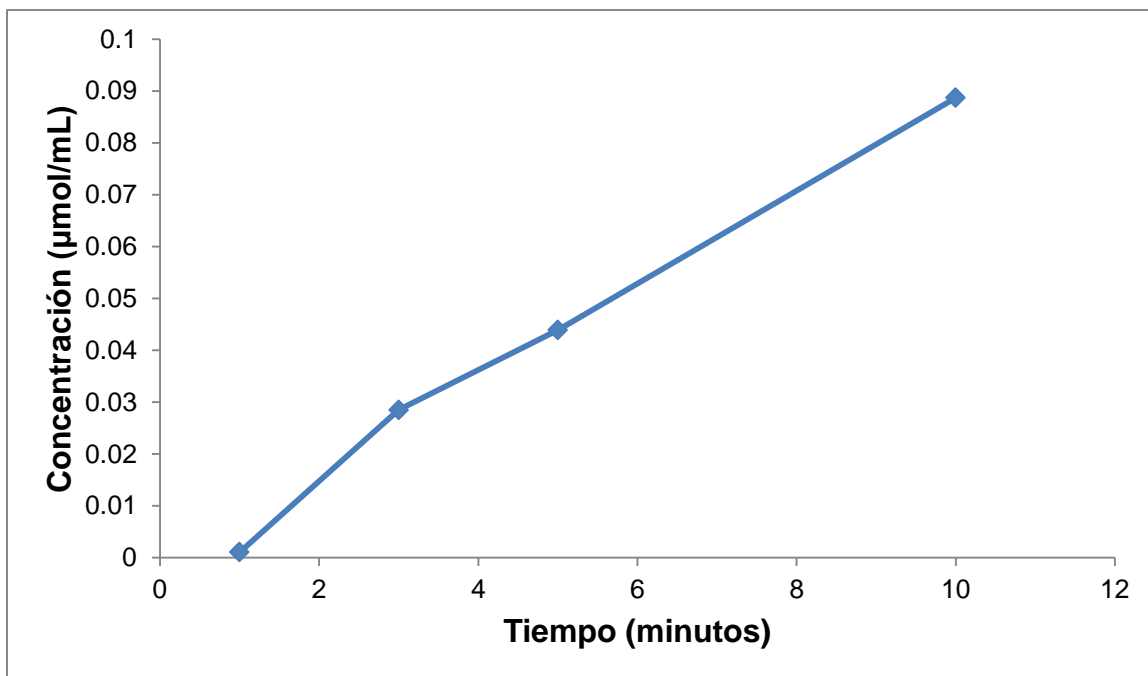
Gráfica de la actividad de la Lacasa en el momento seis para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



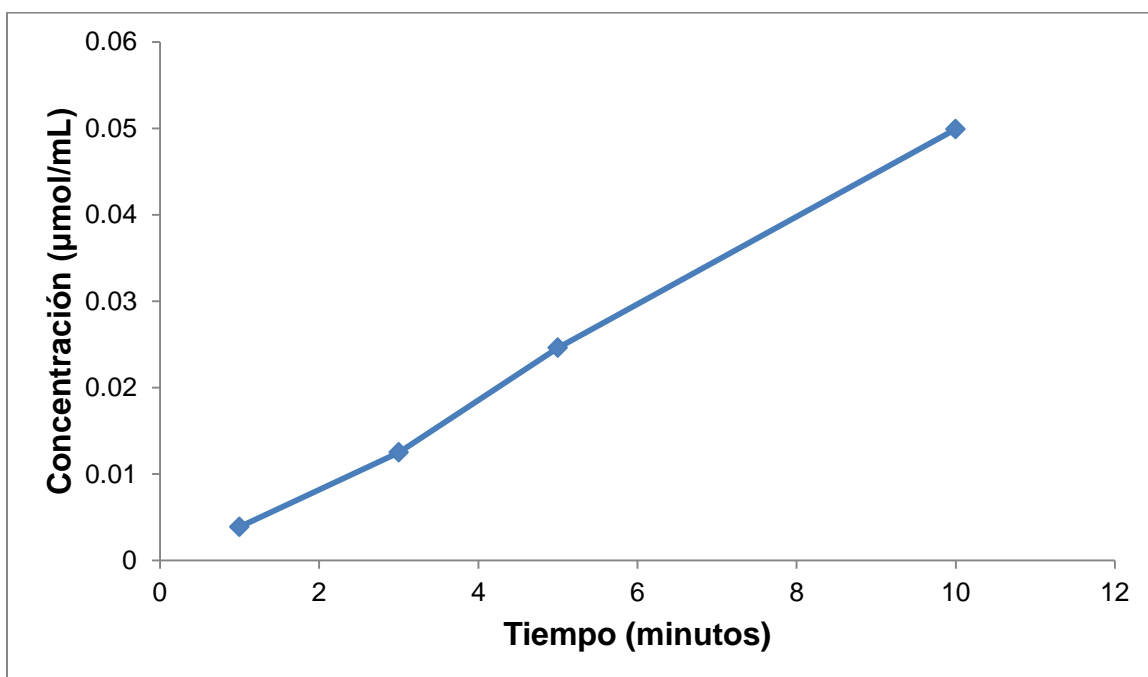
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento cero para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



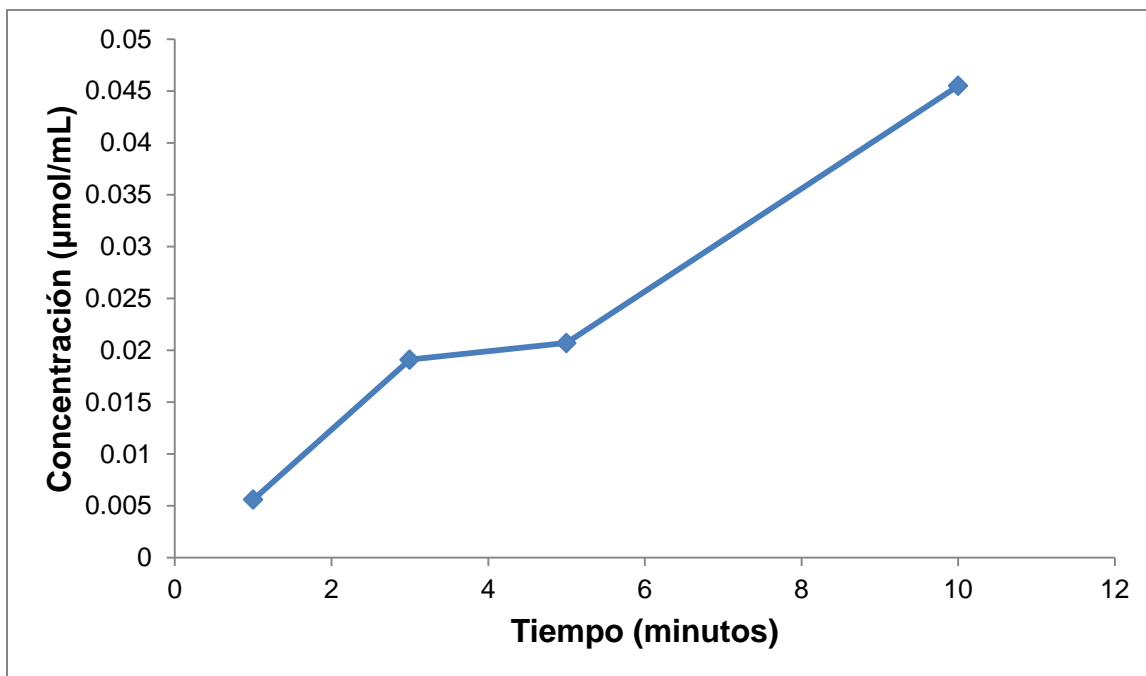
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento dos para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



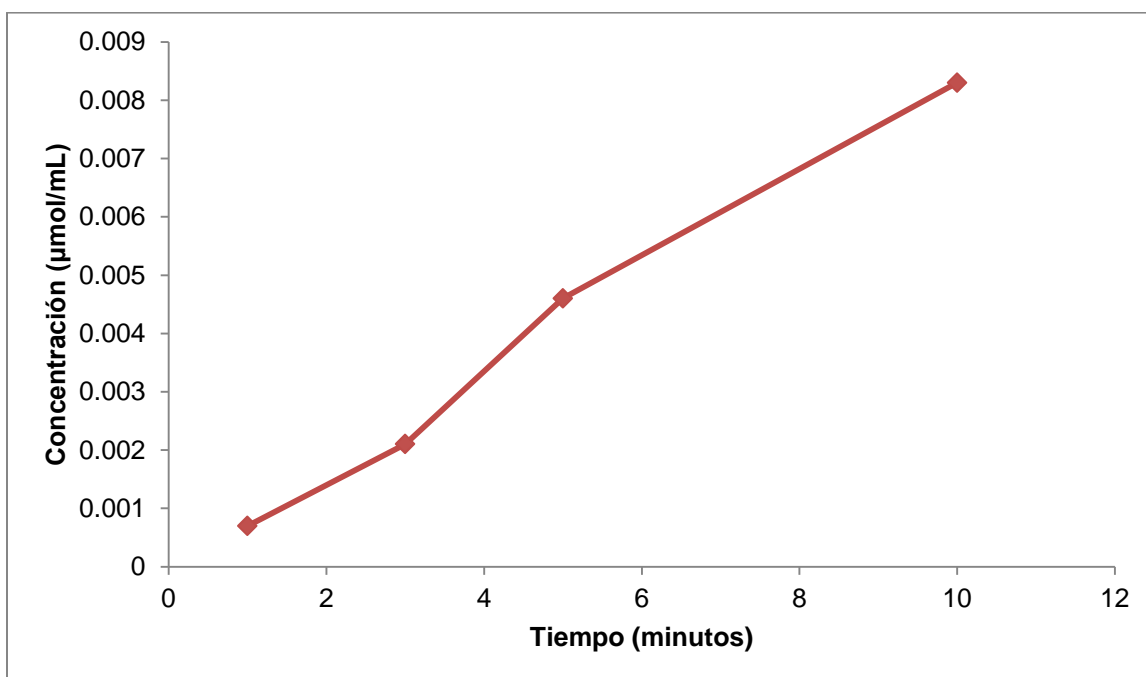
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (2**Pc**)



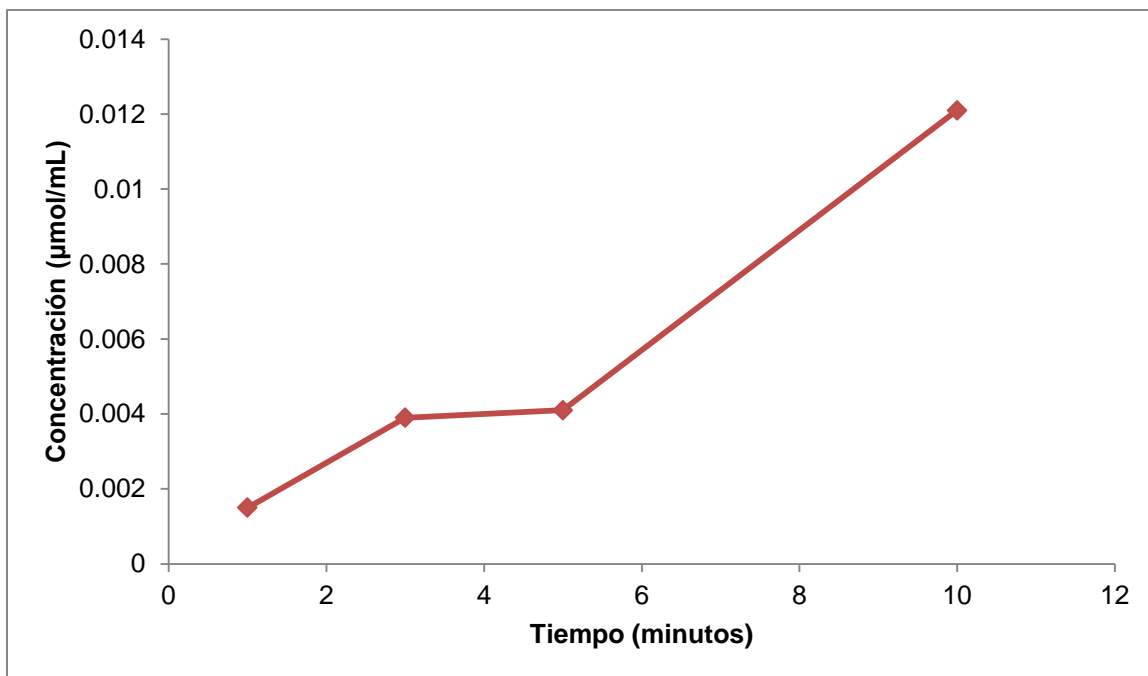
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (2**Pc**)



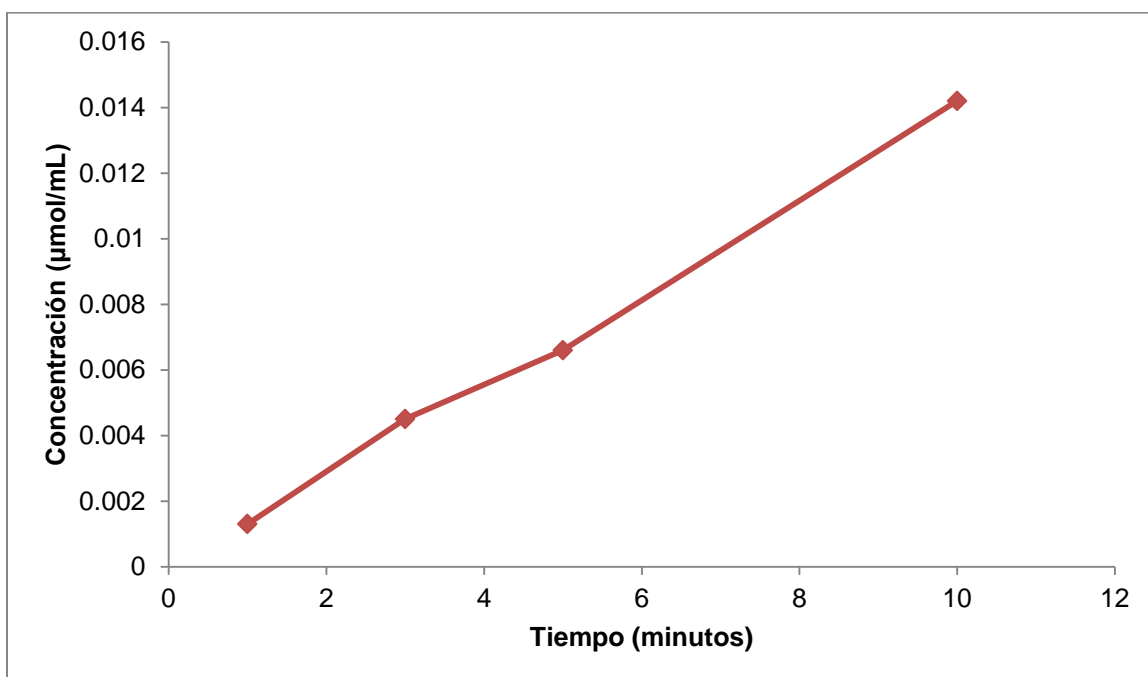
Gráfica de la actividad de la Manganese Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (2Pc)



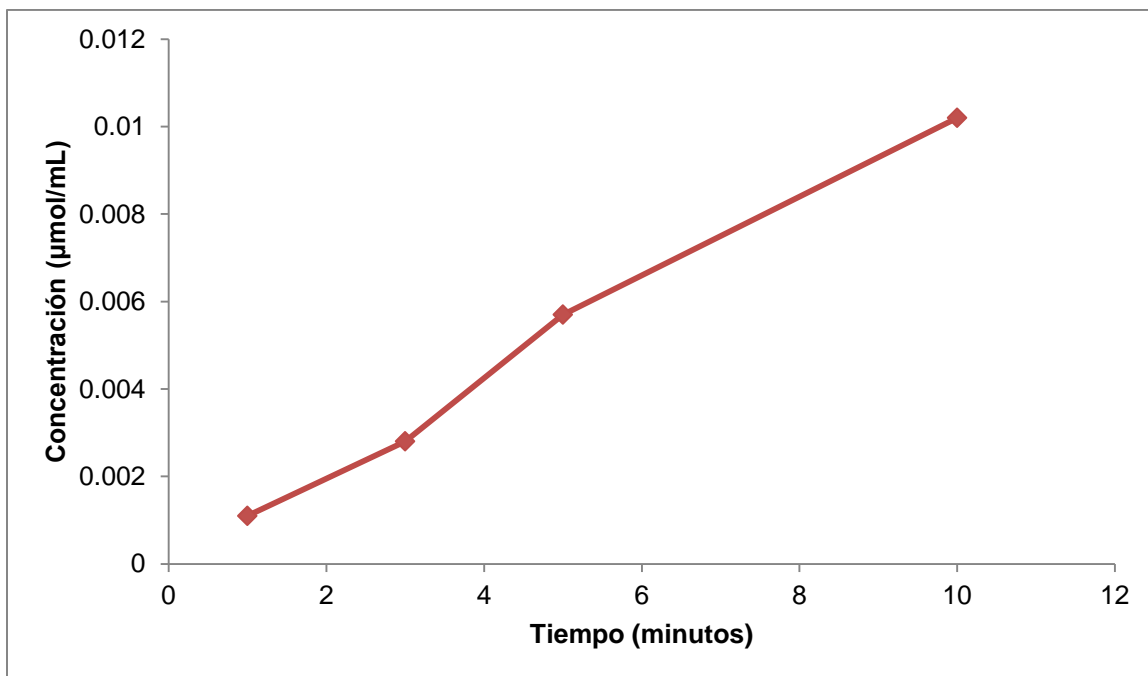
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cero para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (2Pc)



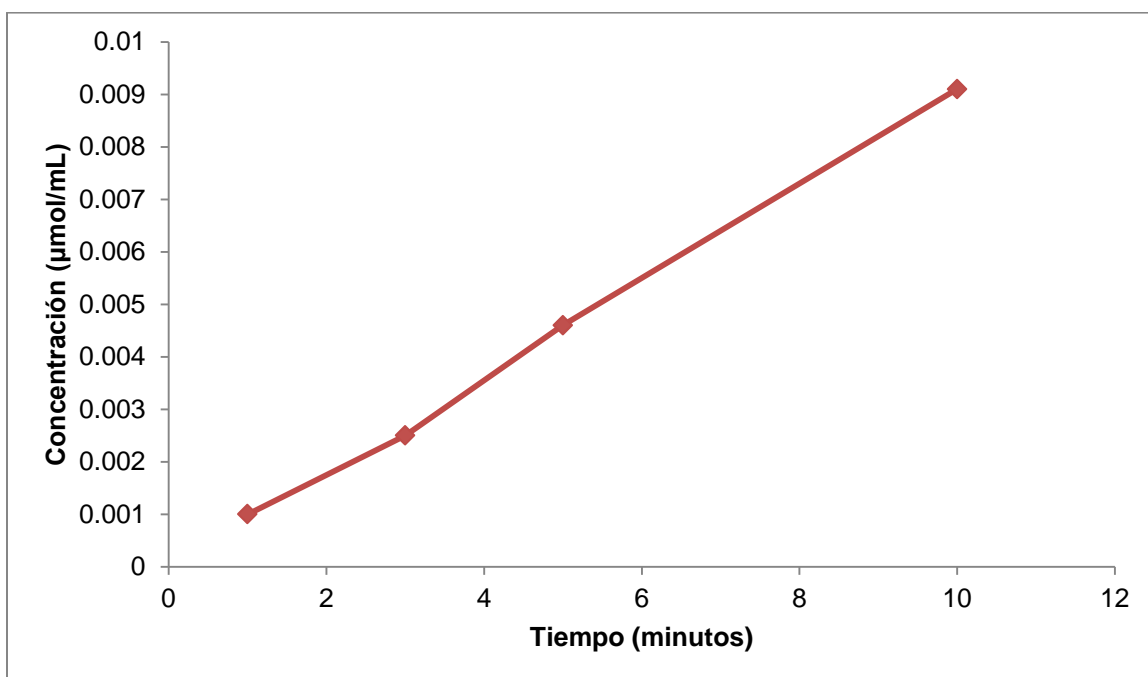
Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento dos para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento tres para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (**2Pc**)



Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento cuatro para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (2Pc)



Gráfica de la actividad de la Lignina Peroxidasa en el momento seis para el hongo *P. cinnabarinus* inmovilizado en olote (2Pc)